

**Medizinische Fakultät  
der  
Universität Duisburg - Essen**

**Aus dem Institut für Pathophysiologie  
Zentrum für Innere Medizin**

**Signaltransduktion des Myokardschutzes  
durch ischämische Postkonditionierung**

**- Experimentelle Untersuchungen am Schwein -**

**I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n  
zur  
Erlangung des Doktorgrades der Medizin  
durch die Medizinische Fakultät  
der Universität Duisburg - Essen**

**vorgelegt von  
Patrick André Vancaster  
aus Essen**

**2012**

---

Dekan:	Herr Univ.-Prof. Dr. med. Jan Buer
1. Gutachter:	Herr Univ.-Prof. Dr. med. Dr. h.c. Gerd Heusch
2. Gutachter:	Frau Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Ursula Rauen

Tag der mündlichen Prüfung:	19. Februar 2013
-----------------------------	------------------

---

---

Wesentliche Teile dieser Arbeit wurden auf Fachkongressen vorgestellt und in wissenschaftlichen Zeitschriften publiziert.

### **Freie Vorträge**

**van Caster P.**, Skyschally A., Gres P., Boengler K., Schulz, R. Heusch G.:

Ischämische Postkonditionierung am Schwein - keine zusätzliche Aktivierung der RISK - Kinasen gegenüber sofortiger Reperfusion.

74. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie. 27.03. - 29.03.2008, Mannheim, Deutschland.

**van Caster P.**, Skyschally A., Gres P., Boengler K., Schulz R., Heusch G.:

Ischemic postconditioning in pigs - no RISK activation beyond that by immediate full reperfusion.

American Heart Association Scientific Sessions 2008. 09.11. - 11.11.2008, New Orleans, Louisiana, USA.

### **Originalarbeit**

Skyschally A.\*, **van Caster P.**\*, Boengler K., Gres P., Musiolik J., Schilawa D., Schulz R., Heusch G. (2009):

Ischemic postconditioning in pigs: no causal role for RISK activation.

Circulation Research 104, 15-18.

\* - die Autoren trugen zu gleichen Teilen bei.

---

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. EINLEITUNG</b>	<b>6</b>
1.1 INFARKTENTSTEHUNG DURCH MYOKARDIALE ISCHÄMIE UND REPERFUSION	6
1.2 INFARKTGRÖßENREDUKTION DURCH ISCHÄMISCHE POSTKONDITIONIERUNG	6
1.3 ISCHÄMISCHE POSTKONDITIONIERUNG AM MENSCHEN	7
1.4 SIGNALTRANSDUKTION DER ISCHÄMISCHEN POSTKONDITIONIERUNG	8
1.4.1 REPERFUSION INJURY SALVAGE KINASE - SIGNALTRANSDUKTIONSWEG	9
1.4.2 ALTERNATIVE SIGNALTRANSDUKTIONSWEGE	10
1.5 ZIELSETZUNGEN DER ARBEIT	12
<b>2. MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>14</b>
2.1 MATERIAL	14
2.1.1 GERÄTE	14
2.1.2 CHEMIKALIEN	15
2.1.3 VERBRAUCHSMATERIALIEN	16
2.2 METHODEN	20
2.2.1 EXPERIMENTELLE ISCHÄMIE UND REPERFUSION AM SCHWEINEHERZEN	20
2.2.2 WESTERN BLOT ANALYSE DER PHOSPHORYLIERUNG DES <i>REPERFUSION INJURY SALVAGE KINASE</i> - SIGNALTRANSDUKTIONSWEGES	25
<b>3. ERGEBNISSE</b>	<b>27</b>
3.1 EXPERIMENTELLE ISCHÄMIE UND REPERFUSION AM SCHWEINEHERZEN	27
3.1.1 SYSTEMISCHE HÄMODYNAMIK	27
3.1.2 SUBENDOKARDIALE RESTDURCHBLUTUNG	28
3.1.3 GRÖÖE DES RISIKOAREALES	28
3.1.4 INFARKTGRÖÖE	29
3.1.5 INFARKTGRÖÖE ALS FUNKTION DER SUBENDOKARDIALEN RESTDURCHBLUTUNG	30
3.1.6 INFARKTGRÖÖE UNTER INHIBIERUNG DES <i>REPERFUSION INJURY SALVAGE KINASE</i> - SIGNALTRANSDUKTIONSWEGES	31
3.2 WESTERN BLOT ANALYSE DER PHOSPHORYLIERUNG DES <i>REPERFUSION INJURY SALVAGE KINASE</i> - SIGNALTRANSDUKTIONSWEGES	32
3.2.1 VERGLEICH ISCHÄMISCHE POSTKONDITIONIERUNG UND SOFORTIGE VOLLSTÄNDIGE REPERFUSION	32
3.2.2 ZEITVERLAUF	32

---

3.2.3	ZEITVERLAUF NACH INHIBIERUNG DER PHOSPHORYLIERUNG VON PI3 - AKT UND MEK1/2 - ERK1/2	33
3.2.4	VERGLEICH INFARZierter UND VITALER PROBEN AUS DEM RISIKOAREAL	37
3.3	ZUSAMMENFASSUNG DER ERGEBNISSE	38
4.	DISKUSSION	39
5.	ZUSAMMENFASSUNG	43
6.	LITERATURVERZEICHNIS	44
7.	ANHANG	56
7.1	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	56
7.2	TABELLENVERZEICHNIS	56
7.3	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	57
8.	DANKSAGUNG	60
9.	LEBENS LAUF	62

# **1. Einleitung**

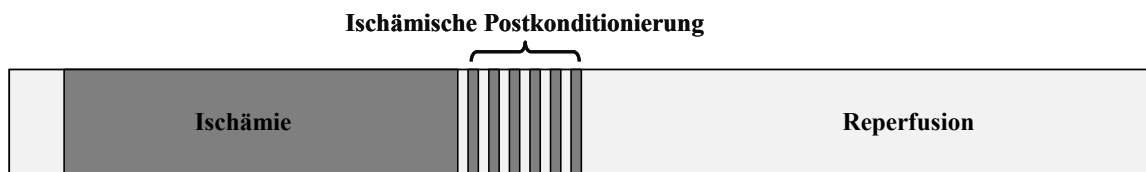
## **1.1 Infarktentstehung durch myokardiale Ischämie und Reperfusion**

Der akute Verschluss einer Koronararterie reduziert die Durchblutung im betroffenen Myokardareal. Die daraus entstehende Sauerstoffunterversorgung des Myokards führt nach längerer Dauer zum Zelltod, auch als Infarzierung bezeichnet. Die irreversible Schädigung beginnt beim Menschen ungefähr 20 min nach dem Koronarverschluss und erreicht das maximale Ausmaß nach ca. sechs h (Übersichtsartikel: Downey *et al.*, 2007). Die finale Infarktgröße hängt von der Größe des Versorgungsareals der Koronararterie, der Restdurchblutung während der Ischämie und der Dauer der Ischämie ab. Da sich infarziertes Myokard nicht regeneriert, führt der Verlust kontraktiler Myokardmasse zu Funktionseinschränkung und Remodeling des Ventrikels (Heusch, 2004; Übersichtsartikel: Pfeffer und Braunwald, 1990). Die Prognose der Patienten hängt somit stark von der finalen Infarktgröße ab (Sutton *et al.*, 1997). Schnellstmögliche Reperfusion ist die einzige Möglichkeit, das Fortschreiten des ischämischen Schadens zu verhindern. Jedoch verursacht auch die Reperfusion selbst einen irreversiblen Myokardschaden durch Nekrose und Apoptose und trägt somit zur finalen Infarktgröße bei (Übersichtsartikel: Becker, 1997; Skyschally *et al.*, 2008).

## **1.2 Infarktgrößenreduktion durch ischämische Postkonditionierung**

Eine Möglichkeit, das Ausmaß des Reperfusionsschadens zu vermindern, stellt das von Zhao vorgeschlagene Konzept der ischämischen Postkonditionierung (IP) dar: Durch wiederholte kurze Unterbrechungen des Blutflusses unmittelbar mit Beginn der Reperfusion (siehe Abbildung 1.1) wird die finale Infarktgröße im Vergleich zur sofortigen vollständigen Reperfusion (SVR) verringert (Zhao *et al.*, 2003). Die optimale Anzahl und Dauer der Unterbrechungen des Blutflusses hängt von der Größe der untersuchten Spezies ab. In den meisten Studien zu IP an Nagerherzen wurden drei bis sechs Zyklen von jeweils zehn s Ischämie und Reperfusion (IR) angewandt. An größeren Herzen wurden tendenziell längere Zyklen eingesetzt. In Studien an Schweinen und Hunden reduzierten sechs bis acht

Zyklen von bis zu 60 s Dauer die finale Infarktgröße. Die kumulative Dauer der durch die IP zusätzlich induzierten Ischämie sollte fünf Prozent der gesamten Ischämiedauer nicht überschreiten (Übersichtsartikel: Skyschally *et al.*, 2009).



**Abb. 1.1: Schema der ischämischen Postkonditionierung**

Die Reduktion der Infarktgröße nach IR durch IP wurde *in vivo* und *in vitro* an Mäusen (Przyklenk *et al.*, 2008), Ratten (Manintveld *et al.*, 2007; Penna *et al.*, 2009), Kaninchen (Philipp *et al.*, 2006; Donato *et al.*, 2007), Hunden (Mykytenko *et al.*, 2007) und Schweinen (Iliodromitis *et al.*, 2006; Übersichtsartikel: Vinten-Johansen, 2007) nachgewiesen.

### 1.3 Ischämische Postkonditionierung am Menschen

Die Arbeitsgruppe um Michel Ovize belegte 2005 in einer kontrollierten, prospektiven, randomisierten, multizentrischen Studie, dass IP auch das menschliche Herz vor Infarzierung schützt und in der klinischen Routine anwendbar ist. Es wurden 30 Patienten mit akutem Myokardinfarkt, bei denen die Zeit zwischen Symptombeginn und Wiederherstellung des Blutflusses weniger als sechs Stunden betrug, mit perkutaner Koronarstentimplantation behandelt. Durch vier Episoden von jeweils 60 s Reokklusion und Reperfusion nach Stententfaltung wurde die Kreatininkinasefreisetzung (Fläche unter der Kurve in den ersten 72 Stunden nach Intervention) um 36% gegenüber alleiniger Stentimplantation reduziert (Staat *et al.*, 2005).

In einer Folgestudie analysierten Thibault *et al.* (2008) die Myokardvitalität sechs Monate nach dem Infarktereignis mittels  $^{201}\text{Thallium}$  Myokardszintigraphie. Bei Patienten, die mit IP behandelt wurden, war die Infarktgröße auf  $11,8 \pm 10,3\%$  signifikant reduziert, im Vergleich zu  $19,5 \pm 13,3\%$  bei Patienten mit alleiniger Stentimplantation. Die Infarktgrößenreduktion spiegelte sich auch in der Herzfunktion wider. Ein Jahr nach dem Infarktereignis war die echokardiographisch gemessene linksventrikuläre Ejektionsfraktion

in der mit IP behandelten Gruppe um 7% signifikant höher als in der Gruppe mit alleiniger Stentimplantation.

Im Gegensatz zum potentesten kardioprotektiven Stimulus, der ischämischen Präkonditionierung, wird die IP nach dem Infarktereignis mit Beginn der Reperfusion appliziert. Dadurch wäre die IP, im Gegensatz zur ischämischen Präkonditionierung, auch bei unvorhersehbaren ischämischen Ereignissen, wie dem akuten Myokardinfarkt, einsetzbar.

Als zusätzliche Manipulation an einem möglicherweise atherosklerotisch veränderten Koronargefäß birgt die IP zusätzliche Risiken, wie z. B. embolische Einschwemmungen aus rupturierenden atherosklerotischen Plaques. Die Kenntnis der molekularen Mechanismen der IP würde eine pharmakologische Protektion ohne mechanische Manipulation an den Koronargefäßen ermöglichen.

## **1.4 Signaltransduktion der ischämischen Postkonditionierung**

Durch intrinsische protektive Signaltransduktionswege ist das Herz in der Lage, sich vor dem IR - Schaden zu schützen. Mehrere kardioprotektive Signaltransduktionswege wurden als mögliche Mediatoren der ischämischen Präkonditionierung und IP vorgeschlagen. Allen Signaltransduktionswegen ist gemein, dass sie auf Mitochondrien als Endeffektoren wirken (Heusch *et al.*, 2008a). Einerseits sind Mitochondrien für das Überleben der Zellen essentiell, da sie durch die Atmungskette ATP synthetisieren. Andererseits sind Mitochondrien an der Regulation des Zelltodes durch Apoptose, Nekrose und Autophagie beteiligt.

An den Mitochondrien scheint vor allem die mitochondriale Permeabilitäts - Transitions - Pore (mPTP) eine wichtige Rolle bei der Entstehung des IR - Schadens zu spielen. Die mPTP erhöht im geöffneten Zustand die Membranpermeabilität unselektiv für Wasser und alle Moleküle mit einer Größe bis 1500 Dalton. Bisher wurden drei Proteine identifiziert, die an der Bildung der mPTP beteiligt sein könnten: Adenin - Nukleotid - Translokase (ANT) in der inneren Mitochondrienmembran, mitochondriales Cyclophilin D (CyPD) in der Mitochondrienmatrix und der spannungsabhängige Anionenkanal (VDAC; Übersichtsartikel: Javadov *et al.*, 2011). Während der Ischämie und vor allem der frühen Reperfusion steigt die Öffnungswahrscheinlichkeit der mPTP durch hohe Konzentrationen von Calcium, reaktiven Sauerstoffspezies und anorganischen Phosphaten sowie durch die



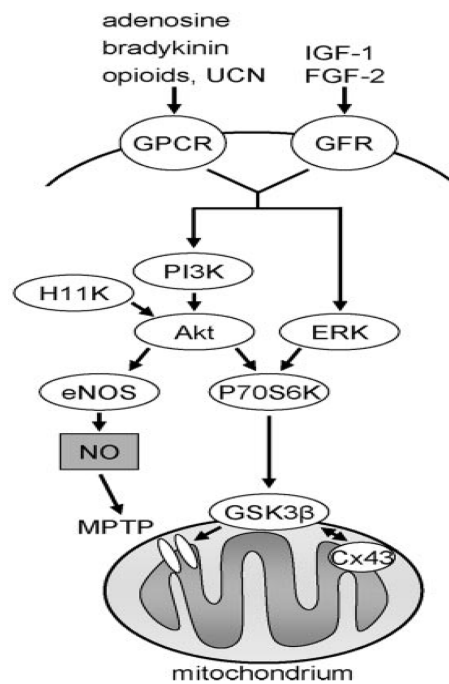
Depolarisation der inneren Mitochondrienmembran stark an (Griffiths und Halestrap, 1995; Javadov *et al.*, 2011). Die mPTP - Öffnung führt durch den Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials zum Versagen der Atmungskette mit konsekutivem ATP - Mangel. Außerdem werden pro - apoptotische Proteine, wie Cytochrom C, aus dem intermembranären Spalt in das Zytosol freigesetzt, die den mitochondrialen Apoptoseweg des Myozyten induzieren.

Eine Intervention an der mPTP während der Reperfusion, die ihre Öffnungswahrscheinlichkeit reduziert, könnte vor Infarzierung schützen (Kerr *et al.*, 1999). Im Rahmen des akuten Myokardinfarktes konnte bereits am Menschen gezeigt werden, dass eine Reduktion der Öffnungswahrscheinlichkeit der mPTP durch Cyclosporin A die Infarktgröße verkleinert (Piot *et al.*, 2008).

#### **1.4.1 Reperfusion Injury Salvage Kinase - Signaltransduktionsweg**

Derek Yellon und seine Mitarbeiter zeigten, dass der *Reperfusion Injury Salvage Kinase* - Signaltransduktionsweg (*RISK*), der eine wichtige Rolle bei der Myokardprotektion durch akute ischämische Präkonditionierung spielt, ebenfalls bei der IP relevant sein könnte (Tsang *et al.*, 2004).

Der *RISK* kann zum einen durch extrazelluläre Mediatoren wie Adenosin, Bradykinin und Opioidpeptid über G - Protein gekoppelte Rezeptoren (GPCR) aktiviert werden. Zum anderen kann er durch insulinähnliche Wachstumsfaktoren (IGF) und Fibroblastenwachstumsfaktoren (FGF) über Wachstumsfaktorrezeptoren (GFR) aktiviert werden (Übersichtsartikel: Ovize *et al.*, 2010). Durch GPCR oder GFR werden Phosphatidylinositol - 3 - Kinase / Proteinkinase B (PI3K / AKT; Tsang *et al.*, 2004; Bopassa *et al.*, 2006) und mitogen - aktivierte Kinase / extrazellulär regulierte Kinase (MEK 1/2 - ERK 1/2; Darling *et al.*, 2005) parallel aktiviert. Die parallelen Kinasewege vereinigen sich bei der P70 - ribosomale - S6 - Proteinkinase (P70S6K), die die Glykogensynthasekinase - 3 - Beta (GSK3 $\beta$ ) phosphoryliert (siehe Abbildung 1.2). Die Phosphorylierung der GSK3 $\beta$  reduziert die Öffnungswahrscheinlichkeit der mPTP (Juhaszova *et al.*, 2004) und verhindert so den mPTP - induzierten Zelltod.



**Abb. 1.2:** Schema des *Reperfusion Injury Salvage Kinase* - Signaltransduktionsweges (Heusch *et al.*, 2008a)

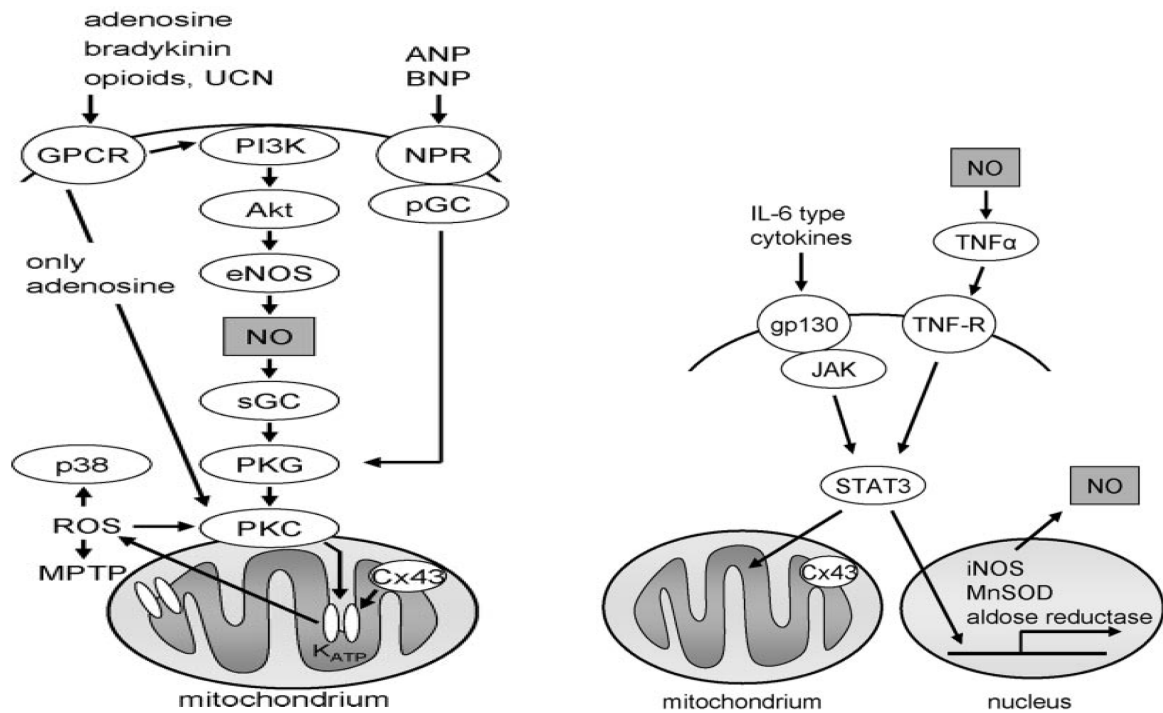
Es ist unklar, ob die Aktivierung einzelner Komponenten des *RISK* oder aber das Zusammenwirken mehrerer Kinasen die Voraussetzung für einen wirksamen Schutz darstellt (Fujita *et al.*, 2007; Morrison *et al.*, 2007; Sivaraman *et al.*, 2007).

#### 1.4.2 Alternative Signaltransduktionswege

Neben dem *RISK* werden hauptsächlich zwei weitere mögliche Signaltransduktionswege des Myokardschutzes (Übersichtsartikel: Heusch *et al.*, 2008a; siehe Abbildung 1.3) diskutiert:

Der Stickstoffmonoxid - Proteinkinase G (NO - PKG) Signaltransduktionsweg (Übersichtsartikel: Burley *et al.*, 2007; Costa *et al.*, 2008) wird über die gleichen Rezeptoren wie der *RISK* aktiviert und vermittelt seine Wirkung über ATP - abhängige Kaliumkanäle an den Mitochondrien.

Von Lecour (2009) wurde ein Signaltransduktionsweg vorgeschlagen, der in Analogie (Heusch, 2009) zu „*RISK*“ als „*SAFE*“ („*survivor activating factor enhancement*“) bezeichnet wird. Er beinhaltet den Tumor - Nekrose - Faktor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), Sphingosin und das Janus Kinase (JAK) / *Signal Transducers and Activators of Transcription 3* (STAT3) - System (Boengler *et al.*, 2008a; Skyschally *et al.*, 2007; Übersichtsartikel: Boengler *et al.*, 2008b; Schulz und Heusch, 2009).



**Abb. 1.3:** Alternative Signaltransduktionswege der ischämischen Postkonditionierung Stickstoffmonoxid - Proteinkinase G Signaltransduktionsweg (links) und *Survivor Activating Factor Enhancement* -Signaltransduktionsweg (rechts; Heusch *et al.*, 2008a)

## 1.5 Zielsetzungen der Arbeit

Die Infarktgrößenreduktion durch IP wurde größtenteils an Herzen kleiner Spezies (Darling *et al.*, 2005) nachgewiesen. Die räumliche und zeitliche Kinetik der Infarktentstehung an Nagerherzen unterscheidet sich jedoch elementar von der am menschlichen Herzen (Übersichtsartikel: Schaper *et al.*, 1988). Daher wurde als Tiermodell für die vorliegende Untersuchung das Göttinger Minischwein gewählt. Das Schweineherz ähnelt in Bezug auf Größe, Koronaranatomie, Herzfrequenz sowie räumlicher und zeitlicher Kinetik der Infarktentstehung dem menschlichen Herzen (Übersichtsartikel: Heusch *et al.*, 2011b; Schaper *et al.*, 1988). Es war umstritten, ob IP auch das Herz des Schweines vor Infarzierung nach IR schützt. Schwartz und Lagranha (2006) beobachteten in einer ersten Studie am Schwein keine Reduktion der Infarktgröße durch IP. Iliodromitis *et al.* (2006) zeigten, dass der Schutz durch IP am Schwein vom gewählten Versuchsprotokoll abhängt.

- I** Ein Ziel dieser Arbeit war die Etablierung eines effektiven Protokolls der IP am Schwein als Grundlage für weitergehende Untersuchungen möglicher Mechanismen des Myokardschutzes.

Die Rolle des *RISK* für den durch IP vermittelten Schutz des Myokards vor den Schäden durch IR wurde größtenteils an Herzen kleiner Spezies untersucht (Tsang *et al.*, 2004; Yang *et al.*, 2004; Yang *et al.*, 2005). Modelle an kleinen Nagerherzen unterliegen durch die geringe Herzgröße möglicherweise methodischen Einschränkungen, da nicht zu verschiedenen Zeitpunkten des Versuchsprotokolls Biopsien aus demselben Tier entnommen werden können. Die große Myokardmasse des Schweineherzens erlaubt die Entnahme multipler Biopsien zu verschiedenen Zeitpunkten des Protokolls aus denselben Herzen.

- II** Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es, erstmals einen Zeitverlauf der Phosphorylierung des *RISK* im Risikoareal während IR darzustellen. Dieser sollte auf einen Ausgangswert vor der Ischämie und ein Kontrollareal in demselben Tier bezogen werden.

Bei kleinen Nagern können Infarktgrößenbestimmung und Western Blot Analyse nicht an denselben Herzen erfolgen. Eine direkte Korrelation von Infarktgrößenreduktion und Phosphorylierung des *RISK* war somit bisher nicht möglich.

**III** Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es, erstmals die Analyse der Infarktgrößenreduktion durch IP und der Phosphorylierung des *RISK* an denselben Herzen durchzuführen und ggf. miteinander zu korrelieren.

In bisherigen Untersuchungen blieb unklar, ob eine gesteigerte Phosphorylierung des *RISK* Ursache oder Konsequenz einer durch IP reduzierten Infarktgröße nach IR ist. Im vorliegenden Modell konnten die Myokardbiopsien retrospektiv den infarzierten und vitalen Anteilen des Risikoareales zugeordnet werden.

**IV** Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung, ob unterschiedlich große Anteile infarzierten Gewebes in den aufgearbeiteten Proben die späteren molekularbiologischen Analysen beeinflussen.

Die Übertragbarkeit von Befunden aus kleinen Nagerherzen auf größere Säugetierherzen ist weder trivial noch selbstverständlich. Vor einer Translation auf den Menschen ist eine Bestätigung der Signaltransduktion an größeren Säugetieren, wie z. B. dem Schwein, unbedingt notwendig (Schwartz *et al.*, 2011).

**V** Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung, ob der *RISK* auch am Schwein als Modell für größere Säugetiere eine Rolle bei der Infarktgrößenreduktion durch IP spielt.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Geräte

##### *2.1.1.1 Geräte und Computerprogramme für Akutversuche an narkotisierten Schweinen und die anschließende Infarktgrößenbestimmung*

Acht - Kanal - Rekorder MK 200A	Gould, Cleveland, OH, USA
Blutgasanalysegerät ABL 510	Radiometer, Kopenhagen, DK
Computerprogramme	
Cordat II	Eigenentwicklung (Skyschally <i>et al.</i> , 1993)
Excel 2003	Microsoft, Seattle, WA, USA
Sigma Stat 2.03	Systat, San José, CA, USA
Elektronischer Druckaufnehmer	Smith Medical, Kirchseeon, DE
Gamma - Zähler Wizard <sup>2</sup> 2480	Perkin Elmer, Waltham, MA, USA
Mikromanometer P5	Konigsberg Instruments, Pasadena, CA, USA
Narkosegerät Sulla 808	Dräger, Lübeck, DE
Rektales Thermometer	Conrad Elektronik, Hirschau, DE
Rollerpumpe Masterflex L/S	Cole - Parmer Instruments, Vernon Hills, IL, USA

##### *2.1.1.2 Geräte und Computerprogramme für molekularbiologische Analysen*

Computerprogramme	
Scion Image	Scion Corp., Frederick, MD, USA
Sigma Stat 2.03	Systat, San José, CA, USA
Excel 2003	Microsoft, Seattle, WA, USA
Gel - und Blottingkammersystem Criterion <sup>TM</sup> XT	Bio - Rad, Hercules, CA, USA
Homogenisator Potter - S	B. Braun, Melsungen, DE
Kühlzentrifuge 5417R	Eppendorf, Hamburg, DE

Mikrotestplatten - Leser Model 680	Bio - Rad, Hercules, CA, USA
Reinstwasseranlage Milli - Q Advantage A 10	Millipore, Schwalbach, DE
Spannungsquelle Power Pac HC	Bio - Rad, Hercules, CA, USA

## **2.1.2 Chemikalien**

### *2.1.2.1 Chemikalien für Akutversuche an narkotisierten Schweinen und die anschließende Infarktgrößenbestimmung*

Dextran T 40	Roth, Karlsruhe, DE
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma - Aldrich, St. Louis, MO, USA
Ethanol (EtOH)	Sigma - Aldrich, St. Louis, MO, USA
Heparin - Natrium	Ratiopharm, Ulm, DE
HydroxyethylstärkeLösung 6% (HES 6%)	B. Braun, Melsungen, DE
Ketamin - Hydrochlorid	Sanofi - Ceva, Düsseldorf, DE
Natriumchloridlösung 0,9% (NaCl 0,9%)	B. Braun, Melsungen, DE
Natriumhydroxid (NaOH)	Fluka, Buchs, SG, CH
Ortho - Phosphorsäure	Sigma - Aldrich, St. Louis, MO, USA
Polyethylenglykol (PEG) 400	Sigma - Aldrich, St. Louis, MO, USA
Thiopental - Natrium	Inresa, Freiburg, DE
Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC)	Sigma - Aldrich, St. Louis, MO, USA
U0126	Sigma - Aldrich, St. Louis, MO, USA
Wortmannin	Sigma - Aldrich, St. Louis, MO, USA

### *2.1.2.2 Chemikalien für molekularbiologische Analysen*

Adefo fix Part 1 Fixierkonzentrat	Adefo - Chemie, Dietzenbach, DE
Albumin Standard	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
Bio - Rad DC Protein Assay	Bio - Rad, Hercules, CA, USA
Blotting Grade Blocker Non - Fat Dry Milk	Bio - Rad, Hercules, CA, USA
Complete - Protease - Inhibitorlösung (7x)	Roche, Basel, CH
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Sigma - Aldrich, St. Louis, MO, USA
Entwickler Neutrol WA	Agfa, Mortsels, BE
Härtelösung X für Fixierbäder	Adefo - Chemie, Dietzenbach, DE
LumiGLO Reagenz (20x) & Peroxid (20x)	Cell Signaling, Danvers, MA, USA
Methanol (MeOH)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA

Natriumchlorid (NaCl)	Sigma - Aldrich, St. Louis, MO, USA
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Serva, Oftringen, CH
NuPAGE Transferpuffer (20x)	Invitrogen, Karlsbad, CA, USA
Ponceau S	Serva, Oftringen, CH
Precision Plus Protein Standard Dual Color	Bio - Rad, Hercules, CA, USA
Tris - Base	Sigma - Aldrich, St. Louis, MO, USA
Tween 20	Bio - Rad, Hercules, CA, USA
Salzsäure (HCl)	Sigma - Aldrich, St. Louis, MO, USA
XT Reducing Agent (20x)	Bio - Rad, Hercules, CA, USA
XT Sample Buffer (4x)	Bio - Rad, Hercules, CA, USA
Zell Lyse Puffer 10x	Cell Signaling, Danvers, MA, USA
β - Mercapto - Ethanol	Sigma - Aldrich, St. Louis, MO, USA
3 - (N - Morpholino) - Propansulfonsäure (MOPS)	Sigma - Aldrich, St. Louis, MO, USA

### 2.1.3 Verbrauchsmaterialien

#### 2.1.3.1 Verbrauchsmaterialien für Akutversuche an narkotisierten Schweinen und die anschließende Infarktgrößenbestimmung

Mikrosphären ( <sup>141</sup> Ce, <sup>51</sup> Cr, <sup>103</sup> Ru, <sup>95</sup> Nb, <sup>46</sup> Sc)	PerkinElmer, Waltham, MA, USA
Nahtmaterial	Mectron, Köln, DE
Schläuche	Masterflex, Gelsenkirchen, DE
Spritzen	B. Braun, Melsungen, DE
Trans - Blot Nitocellulose Membranen (0,2 µm)	Bio - Rad, Hercules, CA, USA
Zentrifugengefäße (15 ml, 50 ml)	Kisker, Steinfurt, DE

#### 2.1.3.2 Verbrauchsmaterialien für molekularbiologische Analysen

Blotting Papier	Schleicher & Schuell, Dassel, DE
Criterion™ XT Precast Gele (10% Bis - Tris)	Bio - Rad, Hercules, CA, USA
Cryoröhrchen	VWR international, West Chester, PA, USA
Hyperfilm ECL	Amersham, Brüssel, BE
Mikrotiterplatten	Kisker, Steinfurt, DE
Pipettenspitzen	Eppendorf, Hamburg, DE; Roth, Karlsruhe, DE



Reaktionsgefäße (0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml)

Eppendorf, Hamburg, DE

## 2.1.4 Puffer und Lösungen

### 2.1.4.1 Puffer und Lösungen für Akutversuche an narkotisierten Schweinen und die anschließende Infarktgrößenbestimmung

Blockersubstanzen

Wortmannin

1 mg in 500 µl EtOH ( $\geq 99,5\%$ )

U0126

10 mg in 500 µl DMSO

mit Natriumchloridlösung + 20% PEG400 auf 2 ml aufgefüllt

Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC) - Färbelösung

Natriumphosphat -Puffer

6,1 ml Ortho - Phosphorsäure (85%)

5,2 g NaOH

43,6 g Dextran T 40

mit NaOH auf  $pH = 7,4$  eingestellt

mit *A. dest* auf 1 l aufgefüllt

Färbelösung

700 ml Natriumphosphat-Puffer

3 g Triphenyltetrazoliumchlorid

### 2.1.4.2 Puffer und Lösungen für molekularbiologische Analysen

Homogenisierungspuffer

143 µl Complete - Protease -Inhibitorlösung (7x)

100 µl Zell Lyse Puffer (10x)

mit *A. dest.* auf 1 ml aufgefüllt

3 - (N-Morpholino) - Propansulfonsäure (MOPS) - Laufpuffer

Stammlösung (10x)

104,6 g MOPS

60,6 g Tris Base

10,0 g SDS

3,0 g EDTA

mit *A. dest.* auf 1 l aufgefüllt

*pH* auf 7,7 eingestellt

Gebrauchslösung

100 ml 10x MOPS - Laufpuffer

900 ml *A. dest.*

Transferpuffer

50 ml 20x NuPAGE Transfer Buffer (Invitrogen)

200 ml MeOH *p. A.*

750 ml *A. dest.*

Tris - gepufferte Natriumchloridlösung (TBS) - Tween

Stammlösung 10x TBS - Puffer

24,2 g Tris Base

80,0 g NaCl

800 ml *A. dest.*

mit HCl auf *pH* = 7,6 eingestellt

mit *A. dest.* auf 1 l aufgefüllt

Gebrauchslösung (TBS - T)

100 ml 10x TBS - Puffer

1 ml Tween 20

900 ml *A. dest.*

„Stripping“ - Puffer

20,0 g SDS

7,6 g Tris Base

800 ml *A. dest.*

mit HCl auf *pH* = 6,8 eingestellt

7,8 ml  $\beta$  - Mercapto - Ethanol

mit *A. dest.* auf 1 l aufgefüllt.

## 2.1.5 Antikörper

### 2.1.5.1 Primärantikörper

<b>Antikörper</b>	<b>mono - / polyklonal</b>	<b>Spezies</b>	<b>Phosphorylierungs - stelle</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Ver - dünnung</b>
Anti - Phospho - AKT	polyklonal	Kaninchen	Serin 473	Cell Signaling	1:500
Anti - AKT	polyklonal	Kaninchen	-----	Cell Signaling	1:500
Anti - Phospho - ERK1/2	monoklonal	Maus	Tyrosin 204	Santa Cruz Biotechnology	1:500
Anti - ERK1/2	monoklonal	Maus	-----	R&D Systems	1:500
Anti - Phospho - P70S6K	polyklonal	Kaninchen	Tyrosin 421 / Serin 424	Cell Signaling	1:500
Anti - P70S6K	polyklonal	Kaninchen	-----	Cell Signaling	1:500
Anti - Phospho - GSK3 $\beta$	polyklonal	Kaninchen	Serin 9	Cell Signaling	1:500
Anti - GSK3 $\beta$	monoklonal	Maus	-----	BD Transduction	1:1000

### 2.1.5.2 Sekundärantikörper

<b>Antikörper</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Ver - dünnung</b>
Peroxidase konjugiertes anti - Maus IgG	Cell Signaling	1:4000
Peroxidase konjugiertes anti - Kaninchen IgG	Cell Signaling	1:4000

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Experimentelle Ischämie und Reperfusion am Schweineherzen

#### 2.2.1.1 Genehmigung

Die Tierversuche wurden von der Bezirksregierung Düsseldorf genehmigt und nach den NIH - Leitlinien für die Handhabung von Labortieren (Publikation 85 - 23 in der revidierten Fassung von 1996) durchgeführt.

#### 2.2.1.2 Präparation und Instrumentierung

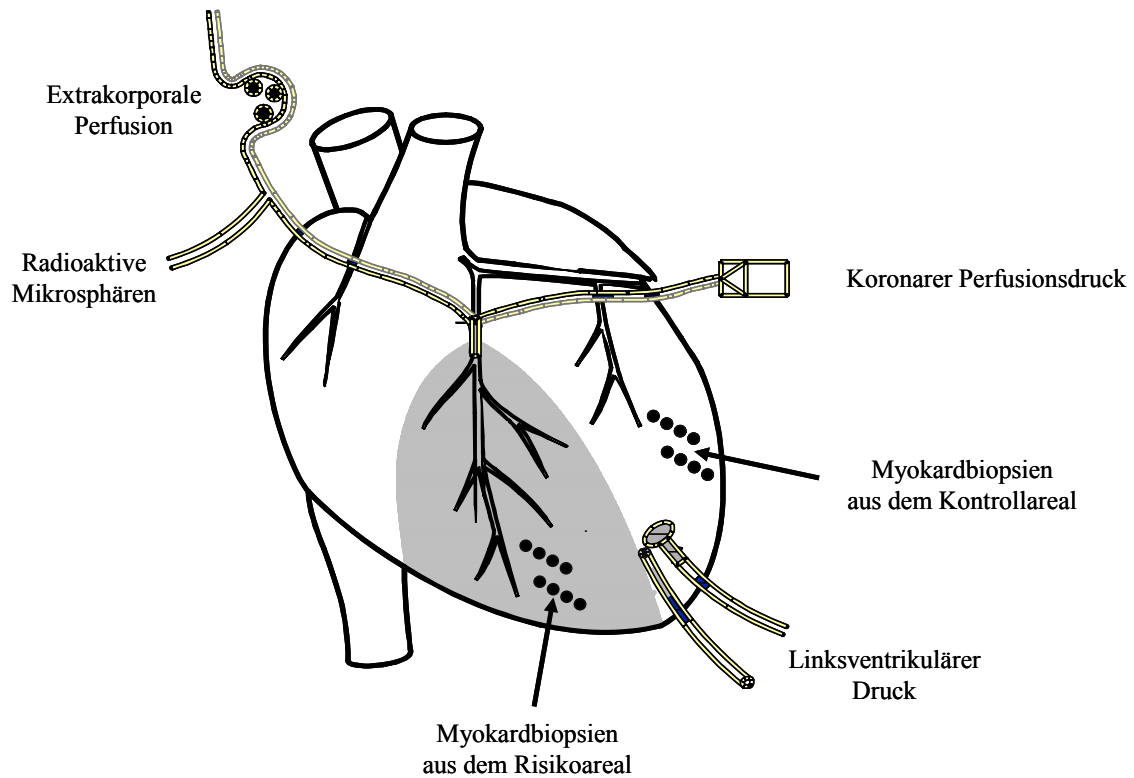
Göttinger Minischweine (männlich, 20 - 40 kg) wurden mit Ketamin (25 mg / kg KG i. m.) sediert und mit Thiopental - Natrium (12,5 mg / kg KG i. v.) narkotisiert. Nach medianer Inzision des Halses wurde die Trachea freipräpariert, eröffnet und intubiert. Die Tiere wurden volumenkontrolliert beatmet. Die Narkose wurde mit Enfluran (1 - 1,5%) und Lachgas aufrechterhalten ( $O_2$  /  $N_2O$ : 40% / 60%). Zur Kontrolle der Blutgaskonzentrationen, der Hämoglobinkonzentration, des Säure - Basen - Haushaltes, der Blutzuckerkonzentration und der Elektrolytkonzentrationen wurde in regelmäßigen Abständen arterielles Blut entnommen. Abweichungen von den Normwerten (Alstrup, 2010) wurden vor Protokollbeginn korrigiert.

Die Körpertemperatur wurde mit einem rektalen Thermometer kontinuierlich überwacht und durch einen beheizten OP Tisch und wärmende Abdeckungen im physiologischen Bereich (Alstrup, 2010) gehalten.

In beide *Arteriae carotides communes* wurden Polyethylenkatheter implantiert. Ein Katheter wurde zur kontinuierlichen Aufzeichnung des arteriellen Blutdruckes mit einem elektronischen Druckaufnehmer konnektiert. Der zweite Katheter diente als zuführender Schenkel der extrakorporalen Zirkulation.

In eine *Vena jugularis* wurde ein Katheter zur Volumensubstitution (NaCl 0,9%, HES 6%; körperwarm) und Medikamentenapplikation implantiert.

Eine linkslaterale Thorakotomie wurde in Höhe des vierten Interkostalraumes durchgeführt und der Perikardbeutel eröffnet. Ein Königsberg Mikromanometer und ein mit NaCl 0,9% gefüllter Katheter wurden durch die Herzspitze im linken Ventrikel platziert und mit einer Tabaksbeutelnaht fixiert. Der Katheter wurde mit einem elektronischen Druckaufnehmer konnektiert und diente der Kalibrierung des Mikromanometers.



**Abb. 2.1: Schematische Darstellung der Instrumentierung**

Nach Antikoagulation (Bolus: 20.000 i. E. Heparin i. v.; Aufrechterhaltung: 10.000 i. E. / h Heparin i. v.) wurde der *Ramus interventricularis anterior* ligiert und umgehend distal der Ligatur kanüliert (siehe Abbildung 2.1). Die Perfusionskanüle wurde mit dem Perfusionssystem, bestehend aus dem Blutentnahmekatheter in der *Arteria carotis*, einer Rollerpumpe mit Windkessel, einem Seitenarm mit Zuspritzmöglichkeit und einem elektronischen Druckaufnehmer, konnektiert. Die Förderleistung der Rollerpumpe (=koronarer Blutfluss, CBF) wurde unter Kontrollbedingungen auf einen minimalen koronararteriellen Perfusionsdruck ( $CAP_{min}$ ) an der Perfusionskanüle von 80 mmHg reguliert. Der Windkessel pufferte herzyklusbedingte Schwankungen des Perfusionsdruckes ab. Durch eine mit dem Windkessel verbundene Perfusorspritze konnte der Perfusionsdruck manuell rasch beeinflusst werden, um die Trägheit der Rollerpumpe zu kompensieren und schnelle Änderungen des Perfusionsdruckes zu ermöglichen.

### 2.2.1.3 Hämodynamik

Mit dem Königsberg Mikromanometer wurde der linksventrikuläre Druck kontinuierlich registriert. Daraus wurden Herzfrequenz (HF), maximaler linksventrikulärer Druck

( $LVP_{\max}$ ) und Maximum der ersten Ableitung des linksventrikulären Druckes nach der Zeit ( $dP/dT_{\max}$ ) errechnet.

Der mittlere koronare Blutfluss ( $CBF_{\text{mean}}$ ) wurde an der Rollerpumpe abgelesen. Der koronararterielle Perfusionsdruck (CAP) wurde mit dem elektronischen Druckaufnehmer an der Perfusionskanüle gemessen und daraus der minimale ( $CAP_{\min}$ ) und der mittlere koronararterielle Perfusionsdruck errechnet ( $CAP_{\text{mean}}$ ).

Die Berechnung und Aufzeichnung der hämodynamischen Parameter erfolgte online mit der CORDAT II Software (Skyschally *et al.*, 1993).

#### 2.2.1.4 Regionale myokardiale Durchblutung

Die regionale myokardiale Durchblutung wurde mit der Mikrosphärenmethode (Heymann *et al.*, 1977) bestimmt: Radioaktiv markierte Mikrosphären ( $^{141}\text{Ce}$ ,  $^{51}\text{Cr}$ ,  $^{103}\text{Ru}$ ,  $^{95}\text{Nb}$  und  $^{46}\text{Sc}$  in randomisierter, wechselnder Reihenfolge) mit einem Durchmesser von 15  $\mu\text{m}$  wurden in das Perfusionssystem injiziert. Die räumliche Verteilung der Mikrosphären im Myokard wurde nach Ende des Experimentes mit einem Gamma - Zähler gemessen. In Verbindung mit dem zum Zeitpunkt der Injektion anliegenden koronaren Blutfluss wurde daraus die regionale myokardiale Durchblutung errechnet.

#### 2.2.1.5 Myokardbiopsien

Mit einem modifizierten Zahnarztbohrer mit Hohlkernbohrkopf wurden aus dem Risikoareal und einem nicht von der Ischämie betroffenen Kontrollareal transmurale Myokardbiopsien mit einem Gewicht von jeweils 10 - 20 mg entnommen. Die Biopsien wurden umgehend in eisgekühlter, steriler NaCl - Lösung von Blut befreit, auf Fließpapier getrocknet und in flüssigem Stickstoff eingefroren.

Die Biopsieentnahmestellen wurden mit verschiedenfarbigen Fäden gekennzeichnet, so dass die einzelnen Biopsien den Entnahmestellen zugeordnet werden konnten. Im Rahmen der späteren Infarktgrößenbestimmung (siehe 2.2.1.6) konnten so Biopsien aus infarzierten und vitalen Myokardarealen unterschieden werden.

#### 2.2.1.6 Risikoareal und Infarktgröße

Am Ende des Versuchsprotokolls wurden die Herzen entnommen und in fünf gleich dicke Scheiben parallel zur Klappenebene geschnitten. Die Größe des Risikoareals wurde mittels der Mikrosphärenmethode bestimmt (Heusch *et al.*, 2008b) und als prozentualer Anteil des linken Ventrikels angegeben. Durch 20 min Inkubation in

Triphenyltetrazoliumchloridlösung (TTC) färbten sich vitale Myokardanteile rot an, infarzierte Myokardanteile blieben ungefärbt. Infarzierte und vitale Myokardanteile wurden mit einem Skalpell separiert und getrennt gewogen. Die Infarktgröße wurde als prozentualer Anteil des infarzierten Gewebes am Risikoareal angegeben.

#### *2.2.1.7 Inhibierung des Reperfusion Injury Salvage Kinase - Signaltransduktionsweges*

Die Phosphorylierung von PI3 - AKT und MEK1/2 - ERK1/2 wurde in zwei Versuchsgruppen inhibiert: Sofortige vollständige Reperfusion mit Inhibierung des *RISK* (SVR+I) und ischämische Postkonditionierung mit Inhibierung des *RISK* (IP+I). Hierzu wurden vor Beginn der Reperfusion Wortmannin als Inhibitor der Phosphorylierung von PI3K (Wymann *et al.*, 1996) und U0126 als Inhibitor der Phosphorylierung von MEK1/2 (Dudley *et al.*, 1995) über den Zuspritzarm des Koronarperfusionssystems infundiert. Die Dosierungen von Wortmannin (1,5 µg/min/kg KG) und U0126 (15 µg/min/kg KG) entsprachen den in anderen Studien publizierten Daten (Strohm *et al.*, 2000; Hirata *et al.*, 2006). Die Infusion der Inhibitoren wurde nach 80 min Ischämie begonnen und nach 10 min Reperfusion beendet. Die Effektivität der Inhibierung der beiden Signaltransduktionswege wurde mittels Western Blot Analyse nach 10 und 30 min Reperfusion überprüft (siehe 2.2.1.5 und 2.2.2).

#### *2.2.1.8 Versuchsprotokolle*

Nach Abschluss der Präparation und Instrumentierung wurde ein stabiler hämodynamischer Status (Kontrollbedingungen, KB) abgewartet, mindestens aber 30 min. Durch Reduktion des koronaren Blutflusses auf 10 - 15% des Wertes unter Kontrollbedingungen wurde eine Myokardischämie induziert.

Nach 90 min Ischämie wurden die Herzen gemäß einem der Reperfusionsprotokolle (2.2.1.8.1 bis 2.2.1.8.4) reperfundiert.

Die Parameter der systemischen Hämodynamik und der regionalen myokardialen Durchblutung wurden unter Kontrollbedingungen, nach 5 und 85 min Ischämie und nach 10, 30 und 60 min Reperfusion registriert (siehe 2.2.1.3 und 2.2.1.4).

Myokardbiopsien wurden unter Kontrollbedingungen, nach 85 min Ischämie (in den Gruppen SVR+I und IP+I nach 80 min Ischämie) und nach 5, 10, 30 und 120 min Reperfusion (in den Gruppen SVR+I und IP+I nach 10 und 30 min) entnommen.

Nach 120 min Reperfusion wurden die Tiere in tiefer Narkose euthanasiert und die Herzen entnommen.

#### *2.2.1.8.1 Sofortige vollständige Reperfusion*

Die Reperfusionsphase wurde eingeleitet durch Erhöhung des koronaren Blutflusses bis zum Erreichen eines minimalen koronararteriellen Perfusionsdruckes von 80 mmHg.

Anschließend wurde der minimale koronararterielle Perfusionsdruck durch kontinuierliche Nachjustierung des koronaren Blutflusses bis zum Ende des Protokolls konstant bei 80 mmHg gehalten (n = 15 Tiere).

#### *2.2.1.8.2 Ischämische Postkonditionierung*

Die Reperfusionsphase wurde eingeleitet durch Erhöhung des koronaren Blutflusses bis zum Erreichen eines minimalen koronararteriellen Perfusionsdruckes von 80 mmHg.

Nach 20 s Reperfusion wurde der koronare Blutfluss durch Anhalten der Rollerpumpe und Abklemmen des Perfusionssystems unterbrochen (n = 13 Tiere). Nach weiteren 20 s wurde wieder ein minimaler koronararterieller Perfusionsdruck von 80 mmHg hergestellt. Nach sechs Zyklen aus Reperfusion und Reokklusion wurde der minimale koronararterielle Perfusionsdruck bis zum Ende des Protokolls durch kontinuierliche Nachjustierung des koronaren Blutflusses konstant bei 80 mmHg gehalten.

#### *2.2.1.8.3 Sofortige vollständige Reperfusion unter Inhibierung der Phosphorylierung des Reperfusion Injury Salvage Kinase - Signaltransduktionsweges*

Die Reperfusion wurde wie in 2.2.1.8.1 durchgeführt. Zusätzlich wurde der *RISK* inhibiert (siehe 2.2.1.7; n = 4 Tiere).

#### *2.2.1.8.4 Ischämische Postkonditionierung unter Inhibierung der Phosphorylierung des Reperfusion Injury Salvage Kinase - Signaltransduktionsweges*

Die Reperfusion wurde wie in 2.2.1.8.2 durchgeführt. Zusätzlich wurde der *RISK* inhibiert (siehe 2.2.1.7; n = 4 Tiere).



## **2.2.2 Western Blot Analyse der Phosphorylierung des *Reperfusion Injury Salvage Kinase* - Signaltransduktionsweges**

### *2.2.2.1 Aufarbeitung der Biopsien*

Die Biopsien wurden in Homogenisierungspuffer überführt, mit einem Potter mechanisch zerkleinert und zur weiteren Aufspaltung mit einem Ultraschallstab 10 s lang sonifiziert. Die festen Bestandteile wurden abzentrifugiert und verworfen. Alle Schritte fanden bei 4 °C statt. Die Proteinkonzentration des Überstandes wurde mittels *Lowry - Assay* (Lowry *et al.*, 1951) bestimmt.

### *2.2.2.2 Gelelektrophorese und Proteintransfer auf Nitrocellulosemembranen*

Jeweils 30 µg Protein wurde mit *Running Buffer* und *Reducing Agent* versetzt und für 5 min auf 95 °C erhitzt. Nach elektrophoretischer Auftrennung in 10% Bis - Tris - Gelen wurden die Proteine auf Nitrocellulosemembranen transferiert. Die Gleichmäßigkeit der Proteinbeladung der Nitrocellulosemembranen wurde mit Ponceau S - Färbung kontrolliert und dokumentiert.

### *2.2.2.3 Inkubation mit Antikörpern*

Die unbesetzten Bindungsstellen der Nitrocellulosemembranen wurden durch Inkubation mit TBS-T mit 5% Milch blockiert. Im Folgenden wurden die Membranen mit Primärantikörpern gegen die phosphorylierten Formen von AKT, ERK1/2, P70S6K, GSK3β und mit den entsprechenden Sekundärantikörpern inkubiert. Die immunoreaktiven Signale wurden mittels Chemilumineszenz detektiert. Nach Entfernung der Primär - und Sekundärantikörper mit Stripping Buffer wurden die Membranen erneut mit TBS-T mit 5% Milch blockiert, anschließend mit Antikörpern gegen die Gesamtformen von AKT, ERK1/2, P70S6K, GSK3β und entsprechenden Sekundärantikörpern inkubiert. Die immunoreaktiven Signale wurden mittels Chemilumineszenz detektiert.

### *2.2.2.4 Auswertung der molekularbiologischen Analysen*

Die Intensitäten der Chemilumineszenzsignale wurden mit der Scion Image Software quantifiziert. Die Signalstärken von Antikörpern gegen phosphorylierte Kinasen wurden auf die Signalstärken von Antikörpern gegen Gesamtformen der jeweiligen Kinasen normiert.

### 2.2.3 Statistik

Soweit nicht anders angegeben, werden alle Daten als Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler präsentiert. Die hämodynamischen Daten und die Phosphorylierung des *RISK* im Zeitverlauf wurden mittels 2 – Wege - ANOVA (Zeit, Gruppe) analysiert. Einzelne Mittelwerte wurden mittels Post - hoc Test (*Fisher's least significance test*) verglichen. Unterschiede zwischen IP und SVR bezüglich der Infarktgröße, der myokardialen Durchblutung und der Phosphorylierung des *RISK* wurden mit ungepaartem t - Test analysiert. Ein p - Wert  $< 0,05$  wurde als signifikant erachtet.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Experimentelle Ischämie und Reperfusion am Schweineherzen

##### 3.1.1 Systemische Hämodynamik

Die systemische Hämodynamik unterschied sich während Kontrollbedingungen und Ischämie nicht zwischen IP und SVR (siehe Tabelle 3.1).

	HF [1/min]	LVP <sub>max</sub> [mmHg]	dP/dt <sub>max</sub> [mmHg/s]	CAP <sub>mean</sub> [mmHg]	CBF <sub>mean</sub> [ml/min]	
IP	KB	93 ± 3	98 ± 2	1394 ± 43	118 ± 3	23,9 ± 1,6
	ISCH5	96 ± 4	83 ± 3*	1050 ± 45*	21 ± 1*	3,1 ± 0,4*
	ISCH85	95 ± 4	85 ± 3*	1167 ± 40	23 ± 1*	3,1 ± 0,4*
	REP10	99 ± 4	78 ± 3*	1269 ± 51	114 ± 4	74,6 ± 5,2*
	REP30	101 ± 5	75 ± 1*	1309 ± 157	112 ± 3	61,8 ± 4,7*
	REP60	113 ± 7*	73 ± 4*	1189 ± 91	123 ± 9	53,7 ± 4,9*
SVR	KB	95 ± 2	96 ± 2	1296 ± 34	119 ± 2	25,4 ± 1,7
	ISCH5	94 ± 3	79 ± 2*	1005 ± 34*	21 ± 1*	2,9 ± 0,2*
	ISCH85	96 ± 3	79 ± 3*	1115 ± 54	22 ± 1*	2,9 ± 0,2*
	REP10	98 ± 3	76 ± 2*	1185 ± 73	107 ± 3	61,0 ± 4,4* <sup>+</sup>
	REP30	109 ± 7*	72 ± 2*	1271 ± 84	103 ± 3*	57,7 ± 4,0*
	REP60	117 ± 6*	75 ± 4*	1472 ± 109	118 ± 7	57,0 ± 4,7*
IP + I	KB	95 ± 4	96 ± 3	1360 ± 32	131 ± 10	21,2 ± 1,0
	ISCH5	91 ± 4	84 ± 3	1003 ± 63*	24 ± 3*	2,0 ± 0,1*
	ISCH80	91 ± 5	86 ± 3	1118 ± 56	23 ± 1*	2,0 ± 0,1*
	REP10	92 ± 5	91 ± 4	1149 ± 68	121 ± 2	69,4 ± 3,7*
	REP30	93 ± 6	85 ± 5	1237 ± 64	116 ± 9	64,1 ± 3,5*
	REP60	95 ± 5	72 ± 7*	1019 ± 152	125 ± 5	63,4 ± 3,2*
SVR + I	KB	99 ± 5	98 ± 3	1406 ± 46	123 ± 5	28,9 ± 3,1
	ISCH5	99 ± 6	86 ± 3	1043 ± 67*	22 ± 1*	2,4 ± 0,3*
	ISCH80	100 ± 7	98 ± 13	1193 ± 80	25 ± 2*	2,5 ± 0,4*
	REP10	100 ± 7	92 ± 4	1241 ± 117	111 ± 13	64,6 ± 4,4*
	REP30	100 ± 7	90 ± 4	1290 ± 70	99 ± 11	62,4 ± 5,2*
	REP60	103 ± 2	77 ± 10 <sup>#</sup>	1098 ± 71	110 ± 12	66,9 ± 5,7*

**Tab. 3.1: Systemische Hämodynamik**

Ischämische Postkonditionierung (IP) vs. sofortige vollständige Reperfusion (SVR) vs. ischämische Postkonditionierung unter Inhibierung des *Reperfusion Injury Salvage Kinase* - Signaltransduktionsweges (IP+I) vs. sofortige vollständige Reperfusion unter Inhibierung des *Reperfusion Injury Salvage Kinase* - Signaltransduktionsweges (SVR+I); KB: Kontrollbedingungen; ISCH5/80/85: Nach 5/80/85 min Ischämie; REP10/30/60: Nach 10/30/60 min Reperfusion; HF: Herzfrequenz; LVP<sub>max</sub>: Maximaler linksventrikulärer Druck; dP/dt<sub>max</sub>: Maximum der ersten Ableitung des LVP nach der Zeit; CAP<sub>mean</sub>: Mittlerer koronararterieller Perfusionsdruck; CBF<sub>mean</sub>: Mittlerer koronarer Blutfluss; (\*p<0,05 vs. KB; <sup>+</sup>p<0,05 vs. IP; <sup>#</sup>p<0,05 vs. IP+I).

### 3.1.2 Subendokardiale Restdurchblutung

Die subendokardiale Restdurchblutung unterschied sich nach 5 min Ischämie nicht zwischen den Gruppen IP und SVR bzw. IP+I und SVR+I (siehe Tabelle 3.2).

	<b>Subendokardiale Restdurchblutung</b> [ml/min/g]	
<b>IP</b>	0,034 ± 0,006	n. s.
<b>SVR</b>	0,031 ± 0,004	
<b>IP + I</b>	0,027 ± 0,003	n. s.
<b>SVR + I</b>	0,029 ± 0,007	

**Tab. 3.2: Subendokardiale Restdurchblutung während Ischämie**

Ischämische Postkonditionierung (IP) vs. sofortige vollständige Reperfusion (SVR); ischämische Postkonditionierung unter Inhibierung des *Reperfusion Injury Salvage Kinase* - Signaltransduktionsweges (IP+I) vs. sofortige vollständige Reperfusion unter Inhibierung des *Reperfusion Injury Salvage Kinase* - Signaltransduktionsweges (SVR+I).

### 3.1.3 Größe des Risikoareales

Die Größe des Risikoareals unterschied sich nicht zwischen den Gruppen IP und SVR bzw. IP+I und SVR+I (siehe Tabelle 3.3).

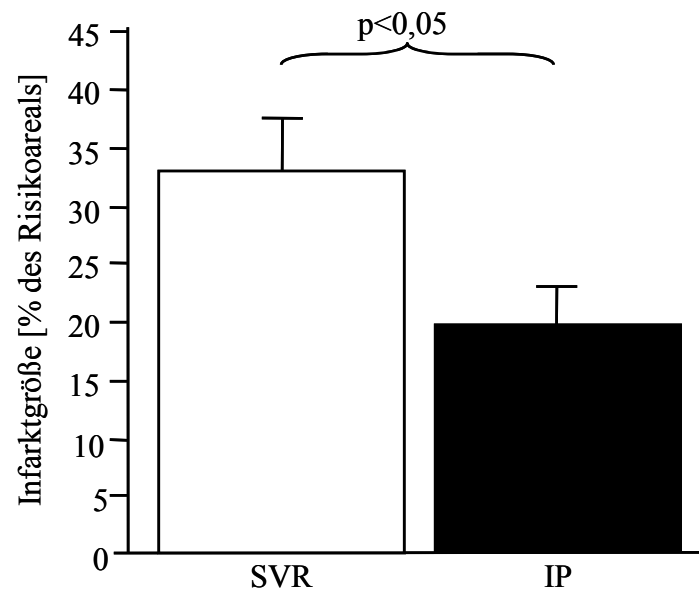
	<b>Risikoareal</b> [% des linken Ventrikels]	
<b>IP</b>	43 ± 2	n. s.
<b>SVR</b>	45 ± 2	
<b>IP + I</b>	41 ± 2	n. s.
<b>SVR + I</b>	48 ± 3	

**Tab. 3.3: Größe des Risikoareals**

Ischämische Postkonditionierung (IP) vs. sofortige vollständige Reperfusion (SVR); ischämische Postkonditionierung unter Inhibierung des *Reperfusion Injury Salvage Kinase* - Signaltransduktionsweges (IP+I) vs. sofortige vollständige Reperfusion unter Inhibierung des *Reperfusion Injury Salvage Kinase* - Signaltransduktionsweges (SVR+I).

### 3.1.4 Infarktgröße

Die Infarktgröße nach IR war mit IP ( $20 \pm 3\%$  des Risikoareals) kleiner als nach SVR ( $33 \pm 4\%$  des Risikoareals; siehe Abbildung 3.1).

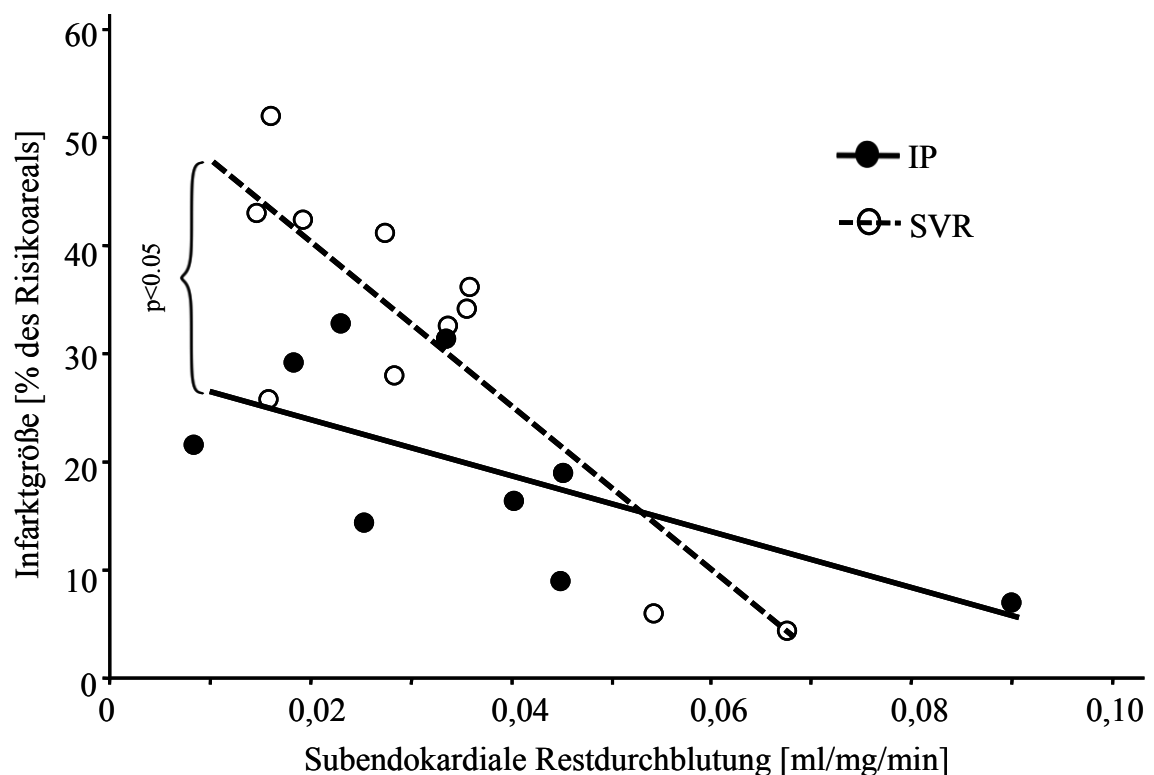


**Abb. 3.1: Infarktgröße**

Sofortige vollständige Reperfusion (SVR) vs. ischämische Postkonditionierung (IP).

### 3.1.5 Infarktgröße als Funktion der subendokardialen Restdurchblutung

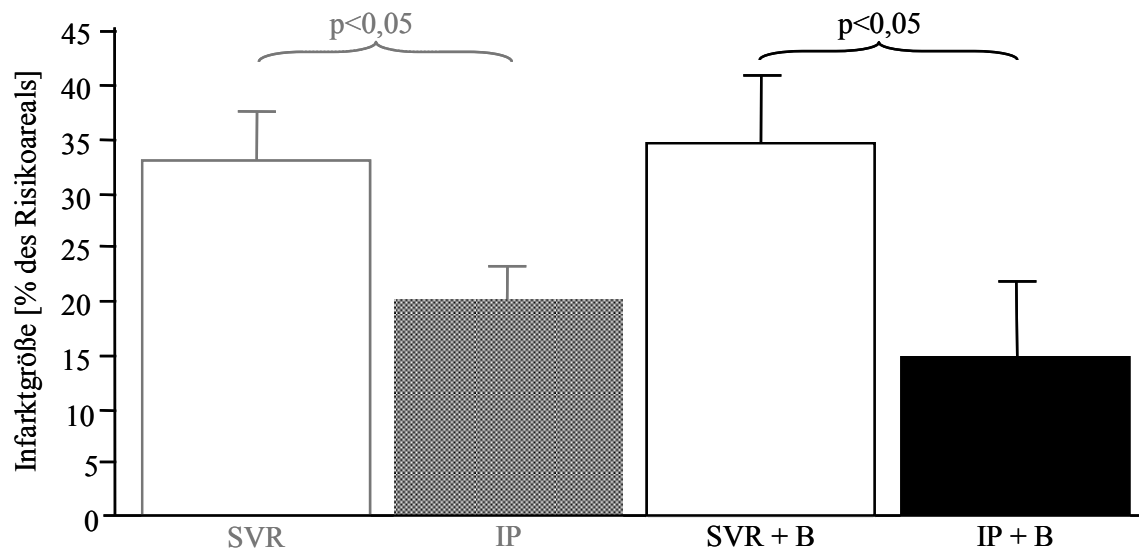
Die finale Infarktgröße hängt sehr stark von der Restdurchblutung während der Ischämie ab (Przyklenk *et al.*, 1986). Daher wurde die Infarktgröße als Funktion der subendokardialen Restdurchblutung während der Ischämie dargestellt. Die Regressionsgrade der Funktion wurde durch IP im Vergleich zur SVR nach unten verschoben (siehe Abbildung 3.2). Somit ist die Infarktgröße bei jeder subendokardialen Restdurchblutung unter 0,053 ml / mg / min reduziert.



**Abb. 3.2: Infarktgröße als Funktion der subendokardialen Restdurchblutung während der Ischämie**  
Ischämische Postkonditionierung (IP) vs. sofortige vollständige Reperfusion (SVR).

### 3.1.6 Infarktgröße unter Inhibierung des *Reperfusion Injury Salvage Kinase* - Signaltransduktionsweges

Die Inhibierung des *RISK* hatte keinen Einfluss auf die Infarktgröße per se (SVR:  $33 \pm 4\%$ ; SVR+I:  $35 \pm 6\%$  des Risikoareals). Die Infarktgröße nach IR unter Inhibierung des *RISK* war mit IP (IP+B:  $15 \pm 7\%$  des Risikoareals) kleiner als nach SVR (SVR+B:  $35 \pm 6\%$  des Risikoareals; siehe Abbildung 3.3).



**Abb. 3.3: Infarktgröße unter Inhibierung des *Reperfusion Injury Salvage Kinase* - Signaltransduktionsweges**

Sofortige vollständige Reperfusion unter Inhibierung des *Reperfusion Injury Salvage Kinase* - Signaltransduktionsweges (SVR+I) vs. ischämische Postkonditionierung unter Inhibierung des *Reperfusion Injury Salvage Kinase* - Signaltransduktionsweges (IP+I).

## 3.2 Western Blot Analyse der Phosphorylierung des *Reperfusion Injury Salvage Kinase* - Signaltransduktionsweges

### 3.2.1 Vergleich ischämische Postkonditionierung und sofortige vollständige Reperfusion

Die unter Kontrollbedingungen, nach 85 min Ischämie und nach 10 min Reperfusion entnommenen Biopsien aller Tiere wurden in jeweils einem Western Blot analysiert. Die Phosphorylierung des *RISK* unterschied sich zu keinem der drei Zeitpunkte zwischen den Gruppen (siehe Tabelle 3.4).

		KB	ISCH85	REP10
AKT	IP	0,53 ± 0,08	0,20 ± 0,05	0,77 ± 0,14
	SVR	0,62 ± 0,10	0,32 ± 0,06	0,83 ± 0,15
ERK1/2	IP	1,08 ± 0,06	0,58 ± 0,12	1,00 ± 0,10
	SVR	1,17 ± 0,08	0,56 ± 0,08	0,91 ± 0,07
P70S6K	IP	0,64 ± 0,08	0,39 ± 0,11	1,34 ± 0,22
	SVR	0,61 ± 0,12	0,49 ± 0,17	1,73 ± 0,24
GSK3β	IP	0,45 ± 0,07	0,24 ± 0,04	0,26 ± 0,04
	SVR	0,56 ± 0,04	0,30 ± 0,06	0,23 ± 0,04

**Tab. 3.4:** Phosphorylierung des *Reperfusion Injury Salvage Kinase* - Signaltransduktionsweges in Myokardbiopsien

Ischämische Postkonditionierung (IP) vs. sofortige vollständige Reperfusion (SVR); Quotient der Signalintensitäten der Chemilumineszenzsignale von Antikörpern gegen phosphorylierte - und Gesamt - Formen der Kinasen AKT, ERK1/2, P70S6K, GSK3β unter Kontrollbedingungen (KB), nach 85 min Ischämie (ISCH85), nach 10 min Reperfusion (REP10); nur die Werte zum gleichen Zeitpunkt können miteinander verglichen werden, da sie von einem Gel stammen.

### 3.2.2 Zeitverlauf

Um einen Zeitverlauf der Phosphorylierung des *RISK* für jedes Tier individuell darzustellen, wurden alle Biopsien eines Tieres auf jeweils einem Gel analysiert. Da sich die Phosphorylierung des *RISK* unter Kontrollbedingungen nicht zwischen den Gruppen unterschied (siehe 3.2.1), wurde dieser Wert als 100% definiert und diente als Ausgangswert für die Darstellung eines Zeitverlaufes der Phosphorylierung des *RISK*. Die Phosphorylierung des *RISK* zu späteren Zeitpunkten wurde dazu in Relation gesetzt.

#### 3.2.2.1 Risikoareal

Die Phosphorylierung von AKT, ERK1/2 und P70S6K in dem Risikoareal war bei 85 min Ischämie im Vergleich zu Kontrollbedingungen tendenziell verringert, die



Phosphorylierung von GSK3 $\beta$  war tendenziell erhöht. Die Phosphorylierung von AKT, ERK1/2, GSK3 $\beta$  und P70S6K unterschied sich bei 85 min Ischämie nicht zwischen den Gruppen IP und SVR (siehe Abbildung 3.4).

Nach 10 und nach 30 min Reperfusion erhöhte sich die Phosphorylierung aller Kinasen in den Gruppen IP und SVR im Vergleich zu Kontrollbedingungen. Nach 120 min Reperfusion zeigte die Phosphorylierung eine abfallende Tendenz im Vergleich zu 30 min Reperfusion. Zu keinem Zeitpunkt der Reperfusion unterschied sich die Phosphorylierung zwischen den Gruppen IP und SVR.

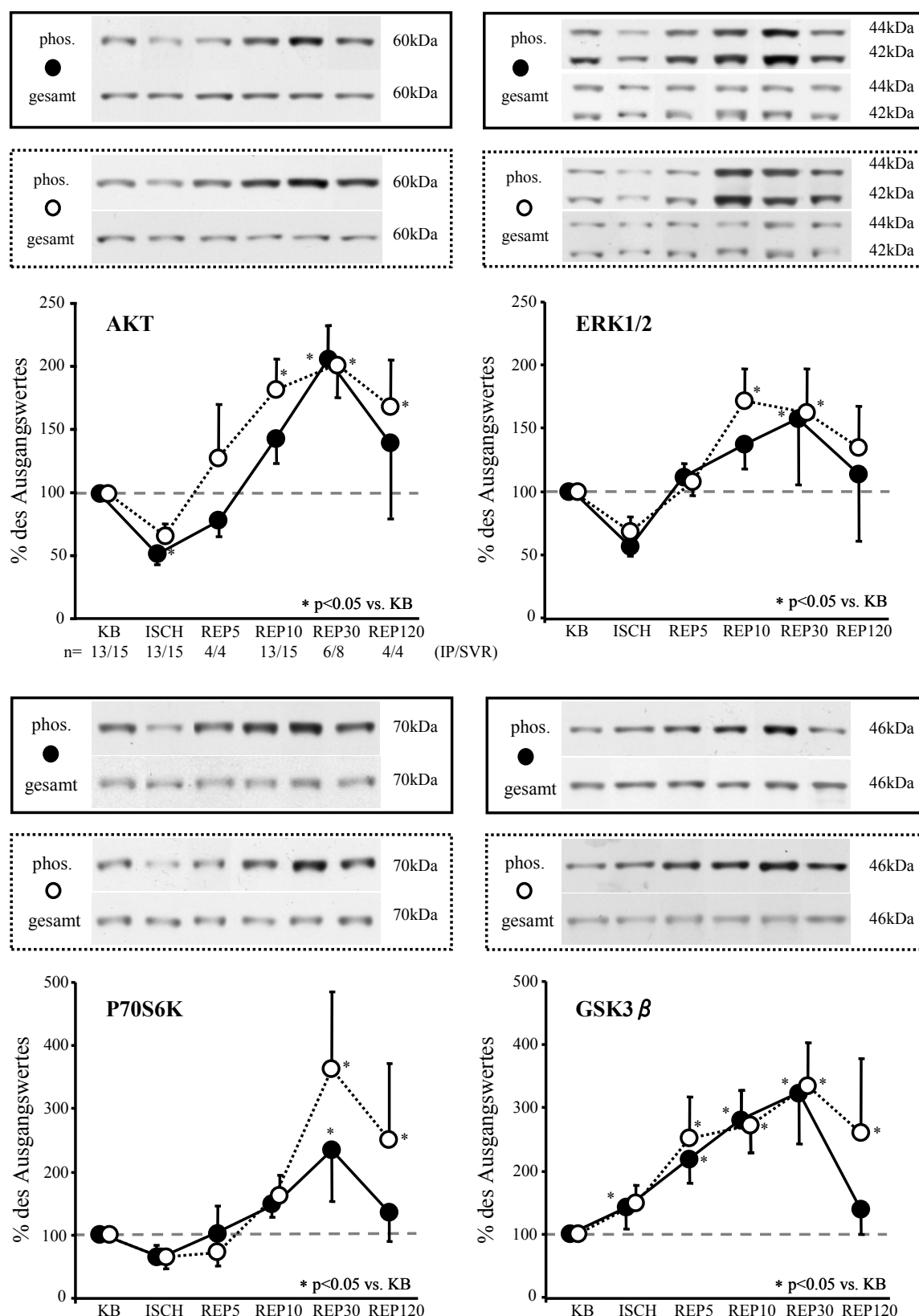
#### *3.2.2.2 Kontrollareal*

In dem Kontrollareal war die Phosphorylierung des *RISK* während des gesamten Versuchsprotokolls stabil und unterschied sich nicht zwischen IP und SVR (siehe Abbildung 3.5).

#### **3.2.3 Zeitverlauf nach Inhibierung der Phosphorylierung von PI3 - AKT und MEK1/2 - ERK1/2**

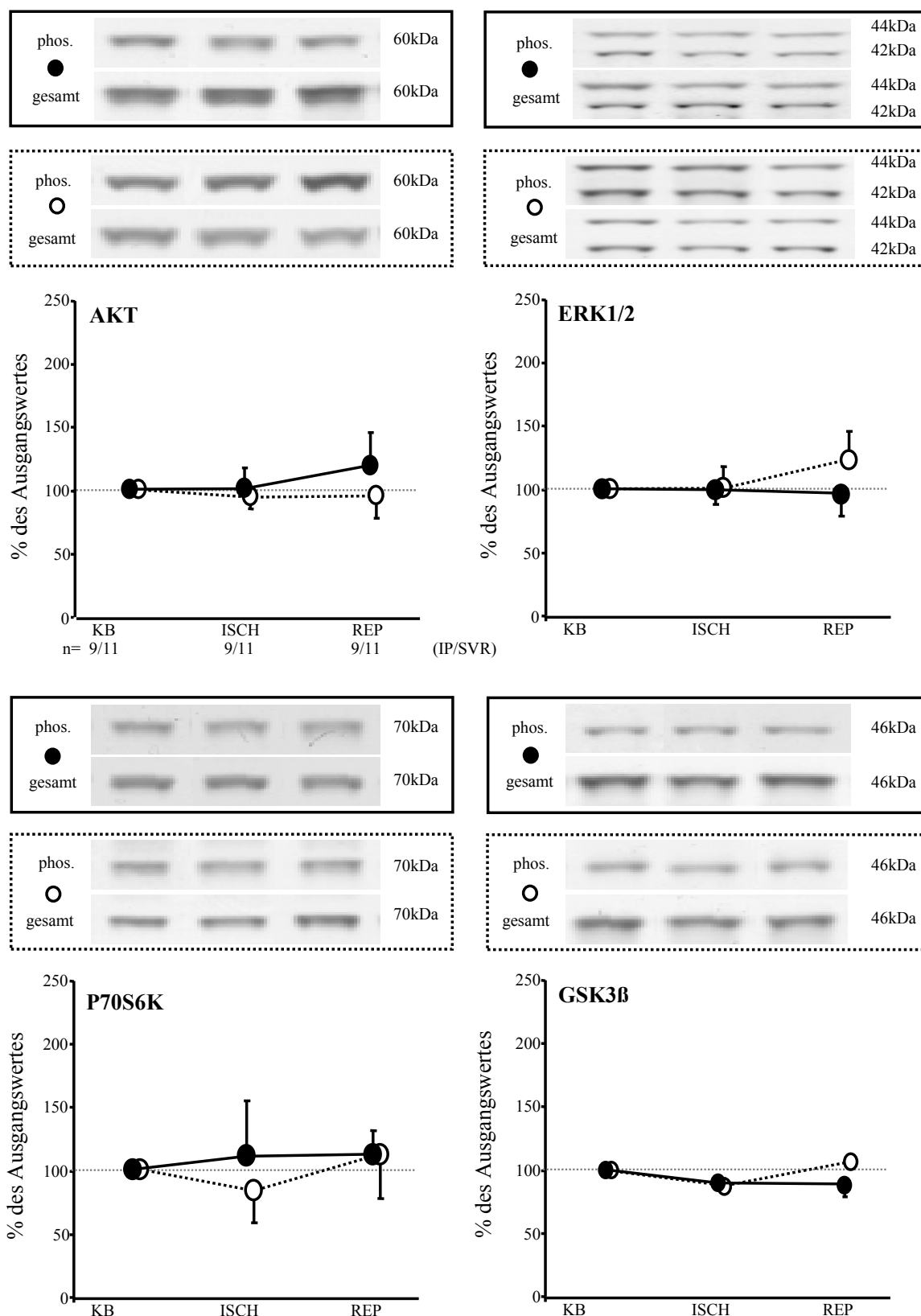
In den Gruppen IP+I und SVR+I war die Phosphorylierung von AKT, ERK1/2 und P70S6K bei 80 min Ischämie im Vergleich zu Kontrollbedingungen tendenziell reduziert, die Phosphorylierung von GSK3 $\beta$  war tendenziell erhöht.

Während der Reperfusion war die Phosphorylierung von AKT und ERK1/2 im Vergleich zu Kontrollbedingungen reduziert, die Phosphorylierung von P70S6K war tendenziell reduziert. Die Phosphorylierung von GSK3 $\beta$  bei 10 min Reperfusion entsprach den Kontrollbedingungen und sank bei 30 min Reperfusion tendenziell ab (siehe Abbildung 3.6).



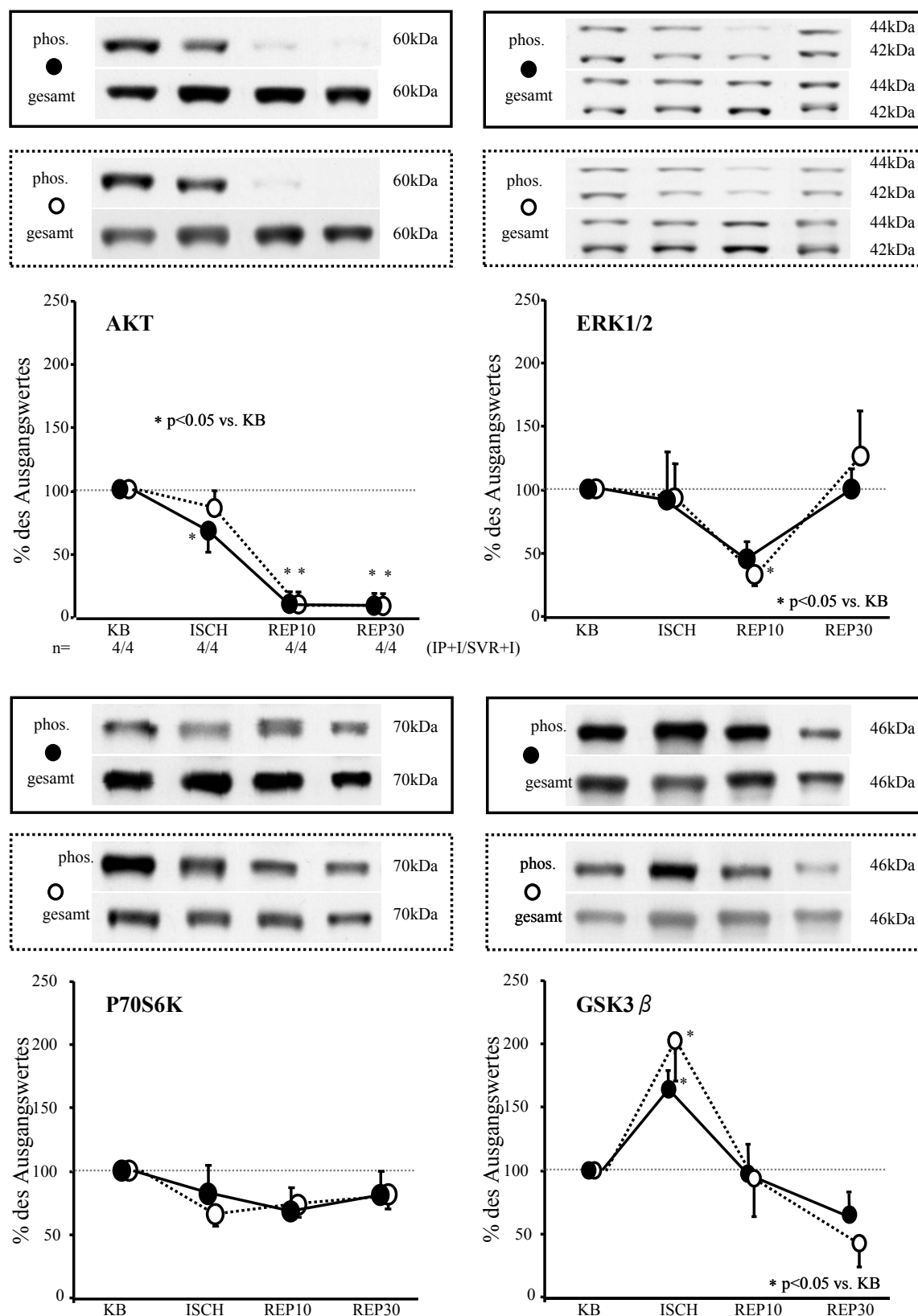
**Abb. 3.4: Repräsentative Western Blots der Phospho- und Gesamtformen der Kinasen AKT, ERK1/2, P70S6K, GSK3β aus Myokardbiopsien des Risikoareals und gemittelte Zeitverläufe der Phosphorylierung des *Reperfusion Injury Salvage Kinase*-Signaltransduktionsweges**

Kontrollbedingungen (KB); 85 min Ischämie (ISCH); 5 / 10 / 30 / 120 min Reperfusion (REP5/10/30/120). Durchgezogene Linien: Ischämische Postkonditionierung (IP); gestrichelte Linien: Sofortige vollständige Reperfusion (SVR). Angegeben sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler.



**Abb. 3.5: Repräsentative Western Blots der Phospho - und Gesamtformen der Kinasen AKT, ERK1/2, P70S6K, GSK3β aus Myokardbiopsien des Kontrollareals und gemittelte Zeitverläufe der Phosphorylierung des *Reperfusion Injury Salvage Kinase* -Signaltransduktionsweges**

Kontrollbedingungen (KB); 85 min Ischämie (ISCH); 10 min Reperfusion (REP). Durchgezogene Linien: Ischämische Postkonditionierung (IP); gestrichelte Linien: Sofortige vollständige Reperfusion (SVR). Angegeben sind Mittelwerte ± Standardfehler.



**Abb. 3.6: Repräsentative Western Blots der Phospho- und Gesamtformen der Kinasen AKT, ERK1/2, P70S6K, GSK3β aus Myokardbiopsien des Risikoareals und gemittelte Zeitverläufe der Phosphorylierung unter Inhibierung mit Wortmannin und U0126**

Kontrollbedingungen (KB); 80 min Ischämie (ISCH); 10 / 30 min Reperfusion (REP10/30). Durchgezogene Linien: Ischämische Postkonditionierung mit Inhibitorgabe (IP+I); gestrichelte Linien: Sofortige vollständige Reperfusion mit Inhibitorgabe (SVR+I). Angegeben sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler.

### 3.2.4 Vergleich infarzierter und vitaler Proben aus dem Risikoareal

Die in der Western Blot Analyse gemessene Phosphorylierung des *RISK* nach 10 min Reperfusion unterschied sich nicht zwischen infarzierten und vitalen Proben aus dem Risikoareal (siehe Tabelle 3.5).

		<b>Phosphorylierung</b> [Signalintensität phosphorylierte - Form der Kinase / Signalintensität Gesamt - Form der Kinase]
<b>AKT</b>	<b>infarziert</b>	0,69 ± 0,15
	<b>vital</b>	0,75 ± 0,24
<b>ERK1/2</b>	<b>infarziert</b>	1,29 ± 0,16
	<b>vital</b>	1,09 ± 0,27
<b>P70S6K</b>	<b>infarziert</b>	2,12 ± 0,65
	<b>vital</b>	1,68 ± 0,69
<b>GSK3β</b>	<b>infarziert</b>	0,25 ± 0,03
	<b>vital</b>	0,44 ± 0,17

**Tab. 3.5: Western Blot Analyse der Phosphorylierung der Kinasen AKT, ERK1/2, P70S6K, GSK3β aus nach 10 min Reperfusion entnommenen Biopsien aus infarziertem vs. vitalem Gewebe**

Quotient der Signalintensitäten der Chemilumineszenzsignale von Antikörpern gegen phosphorylierte - und Gesamt - Formen der Kinasen AKT, ERK1/2, P70S6K, GSK3β. Nur die beiden Werte einer Kinase dürfen miteinander verglichen werden, da sie von einem Gel stammen.

### 3.3 Zusammenfassung der Ergebnisse

- I** Die Infarktgröße nach 90 min Ischämie wurde durch sechs Zyklen von 20 s Reperfusion und Reokklusion (IP) reduziert im Vergleich zu SVR (siehe 3.1.4).
- II** Die Phosphorylierung des *RISK* in dem Risikoareal stieg mit der Reperfusion an, ohne Unterschied zwischen den Gruppen IP und SVR (siehe 3.2.2.1).  
In dem Kontrollareal blieb die Phosphorylierung des *RISK* über den Zeitverlauf unverändert (siehe 3.2.2.2).  
Die Gabe von Inhibitoren des *RISK* verhinderte eine verstärkte Phosphorylierung des *RISK* im Risikoareal (siehe 3.2.3).
- III** Die Phosphorylierung des *RISK* unterschied sich zu keinem Zeitpunkt zwischen den Gruppen IP und SVR (siehe 3.2.1). Die Infarktgröße hingegen war nach IP reduziert im Vergleich zu SVR (3.1.4). Eine Korrelation zwischen Infarktgrößenreduktion durch IP und Phosphorylierung des *RISK* bestand nicht.
- IV** Die Phosphorylierung des *RISK* wurde nicht dadurch beeinflusst, ob eine Biopsie aus dem vitalen oder dem infarzierten Anteil des Risikoareals stammt (siehe 3.2.4).
- V** Die Inhibierung des *RISK* hatte keinen Einfluss auf die Infarktgröße per se und auf die Infarktgrößenreduktion durch IP (siehe 3.1.5).

## 4. Diskussion

Die vorliegenden Untersuchungen belegen, dass beim Schwein ein IP - Protokoll mit sechs Zyklen von jeweils 20 s Reperfusion und Reokklusion die Infarktgröße nach IR deutlich reduziert. Diese Infarktgrößenreduktion am Schwein durch IP war bisher umstritten (Schwartz und Lagranha, 2006; Iliodromitis *et al.*, 2006).

Extrapoliert auf Patienten mit akutem Myokardinfarkt ist die beobachtete Infarktgrößenreduktion durch IP von hoher klinischer Relevanz: Eine Reduktion der Infarktgröße um 20% bedeutet eine Reduktion der 6 - Monats - Mortalität um 30% (Burns *et al.*, 2002). Obwohl die Wirksamkeit der IP am Menschen seit vielen Jahren mit klinischen Studien eindeutig belegt ist, wird sie noch immer nicht in der klinischen Routine bei Patienten mit akutem Myokardinfarkt eingesetzt (Übersichtsartikel: Skyschally *et al.*, 2008). Möglicherweise scheiterte die Übertragung tierexperimenteller Daten in die klinische Routine bisher daran, dass Tierexperimente den klinischen Alltag nur unzureichend abbilden. Die Experimente wurden an jungen und gesunden Tieren durchgeführt, es sind jedoch größtenteils ältere, multimorbide Patienten, möglicherweise mit mehrfacher Vormedikation, die einen akuten Myokardinfarkt erleiden (Übersichtsartikel: Ferdinandy *et al.*, 2007). Kenntnisse darüber, welche Begleitfaktoren wie z. B. Lebensalter oder Vormedikation den Myokardschutz durch IP beeinflussen, würden bei der Identifikation von Patienten helfen, die von einer Behandlung mit IP profitieren könnten (Boengler *et al.*, 2008a).

Das Konzept, dass der Myokardschutz durch IP auf einer vermehrten Phosphorylierung des *RISK* basiert (Übersichtsartikel: Hausenloy und Yellon, 2006), wird durch diese Studie nicht unterstützt. Die Phosphorylierung des *RISK* war während der frühen Reperfusion sowohl nach IP als auch nach SVR erhöht. Ein Unterschied in der Phosphorylierung zwischen IP und SVR war nicht nachweisbar. Auch bei effektiver Inhibierung des *RISK* während der Reperfusion reduzierte IP noch die Infarktgröße in unverändertem Maße. Auf eine längere Inhibierung des *RISK* wurde verzichtet, da IP nur bei Anwendung in der frühen Reperfusionsphase die Infarktgröße reduzieren kann (Kin *et al.*, 2004; Philipp, S *et al.*, 2004; Yang *et al.*, 2004), das Maximum der Phosphorylierung des *RISK* in der vorliegenden Studie bei 30 min Reperfusion erreicht wird und sich die mittels TTC -

Färbung gemessene Infarktgröße ab 30 min Reperfusion nicht mehr ändert (Schwarz *et al.*, 2000).

Die vorliegenden Ergebnisse führen zu dem Schluss, dass eine erhöhte Phosphorylierung des *RISK* beim Schwein nicht kausal am Schutz durch IP gegen Infarzierung beteiligt ist. Dies steht im Gegensatz zu Befunden an Nagerherzen, die eine kausale Rolle des *RISK* für den Myokardschutz durch IP zeigen. (Tsang *et al.*, 2004). Eine mögliche, aber nicht zufriedenstellende Erklärung könnten Speziesunterschiede zwischen kleinen Nagern und größeren Säugern sein. Außerdem könnte die Messung einer erhöhten Phosphorylierung des *RISK* nach IP in Herzen kleiner Nager durch einen geringeren Anteil an infarziertem Gewebe in den aufgearbeiteten Proben erklärt werden. Die Hypothese, dass die verstärkte Phosphorylierung des *RISK* nicht Ursache, sondern Folge einer reduzierten Infarktgröße nach IP ist, wurde jedoch durch diese Untersuchungen nicht bestätigt, da sich die Phosphorylierung des *RISK* in infarzierten Anteilen des Risikoareales nicht von der in vitalen Anteilen unterschied.

Allerdings ist die Rolle des *RISK* für den durch IP vermittelten Myokardschutz auch bei Nagern nicht unumstritten. Gleichzeitige Phosphorylierung von AKT und ERK1/2 (Morrison *et al.*, 2007), aber auch alleinige Phosphorylierung von ERK1/2 und nicht der AKT (Przyklenk *et al.*, 2008) wurde an Mäusen beschrieben. Die Inhibierung der Phosphorylierung der AKT verhinderte die durch IP vermittelte Infarktgrößenreduktion in Ratten (Tsang *et al.*, 2004) und Kaninchen (Yang *et al.*, 2005), aber nicht in Mäusen (Przyklenk *et al.*, 2008).

Nishino *et al.* (2008) stellten die Rolle der GSK3 $\beta$  bei der ischämischen Präkonditionierung und IP in Frage. Ergebnisse aus Untersuchungen an genetisch modifizierten Mäusen standen im Gegensatz zu denen einer vorhergehenden Studie an Mäusen mit dem gleichen Genom (Gomez *et al.*, 2008). Murphy und Steenbergen (2008) merkten dazu kritisch an, dass eine genetisch ausgeschaltete GSK3 $\beta$  möglicherweise durch andere Signaltransduktionswege kompensiert werde. Folglich würde der Ausfall der GSK3 $\beta$  durch genetische Modifikation nicht ihren eigentlichen Stellenwert widerspiegeln.

Unsere Befunde nach pharmakologischer Inhibierung des *RISK* bestätigen, dass IP die Infarktgröße nach IR auch ohne gesteigerte Phosphorylierung des *RISK* reduziert. Die Effektivität der Inhibierung des *RISK* wurde durch Western Blot Analyse nachgewiesen.

Unsere Studie geht über bisherige Untersuchungen des *RISK* hinaus, da sie nicht nur den Einfluss einzelner Anteile des *RISK*, sondern des gesamten *RISK* auf die



Infarktgrößenreduktion durch IP untersucht. Die hierarchische Organisation des *RISK* wurde dadurch bestätigt, dass die Inhibierung von PI3 - AKT und MEK1/2 - ERK1/2 ebenfalls die Phosphorylierung von P70S6K und GSK3 $\beta$  reduzierte.

Wenn der *RISK* als Mediator der IP ausgeschlossen ist, was bleibt als möglicher Mechanismus der Infarktgrößenreduktion durch IP beim Schwein?

IP verzögert die Normalisierung der Azidose nach IR und wirkt möglicherweise so durch eine reduzierte Öffnungswahrscheinlichkeit der mPTP dem Zelltod entgegen (Cohen *et al.*, 2007; Inserte *et al.*, 2008). Die länger andauernde Azidose während der frühen Reperfusionphase wurde ebenfalls mit einer Aktivierung des *RISK* in Verbindung gebracht (Fujita *et al.*, 2007). Unklar blieb jedoch, ob die Verlängerung der Azidose per se oder die Aktivierung des *RISK* durch die Azidose Mediator des vermittelten Schutzes war.

Der *SAFE* - Signaltransduktionsweg ist möglicherweise ein weiterer Signaltransduktionsweg der IP, der unter Beteiligung des „*signal transducer and activator of transcription 3*“ (*STAT3*) den *RISK* ersetzt oder ergänzt. Lacerda *et al.* (2009) zeigten über einen pharmakologischen und transgenen Ansatz in einem Modell der globalen IR an isolierten Mäuseherzen, dass eine effektive IP die Präsenz von TNF $\alpha$  und dem TNF Rezeptor 2, nicht aber dem TNF Rezeptor 1, voraussetzt. In dieser Studie zeigte sich erstmals, dass der TNF Rezeptor 2 (Schulz und Heusch, 2009) im Zusammenhang mit IP eine schützende Rolle übernehmen könnte. Der protektive Effekt von exogenem TNF $\alpha$  im Zusammenhang mit IP war ebenfalls abhängig von dem TNF Rezeptor 2 und von STAT 3, nicht aber von der PI3 - Kinase / AKT oder ERK1/2 (Lacerda *et al.*, 2009). STAT3 ist für die Wirkung von IP an der Maus entscheidend (Boengler *et al.*, 2008a), möglicherweise reduziert er parallel zum *RISK* die Öffnungswahrscheinlichkeit der mPTP (Boengler *et al.*, 2010). An isolierten Herzen vermittelt STAT3 die Infarktgrößenreduktion durch Insulin (Fuglestad *et al.*, 2008). Am Schwein erhöht IP die Phosphorylierung der mitochondrialen STAT3 am Tyrosin 705. Dies geht einher mit einer besser erhaltenen Komplex - 1 - Atmung und Inhibierung der mPTP - Öffnung (Heusch *et al.*, 2011a). Eine Inhibierung der Januskinase / STAT Signaltransduktion mit AG490 *in vivo* verhindert sowohl die Infarktgrößenreduktion als auch die besser erhaltene Mitochondrienfunktion durch IP.

Sphingosin - Kinase - 1 ist das Schlüsselenzym bei der Bildung von Sphingosin - 1 - Phosphat und spielt bei dem Myokardschutz durch IP an der Maus eine wichtige Rolle (Jin *et al.*, 2008). Die Aktivierung der Sphingosin - Kinase - 1 wird möglicherweise durch STAT3 gesteuert (Kelly *et al.*, 2008). Sphingosin (Lecour *et al.*, 2002) und STAT3 (Lecour *et al.*, 2005) sind ebenfalls Teile des Signaltransduktionsweges, über den TNF $\alpha$

einen Myokardschutz durch Präkonditionierung vermitteln kann. Der von  $\text{TNF}\alpha$  induzierte Myokardschutz ist nicht abhängig von AKT und ERK1/2 (Lecour *et al.*, 2005) und wurde bereits in Schweinen nachgewiesen (Skyschally *et al.*, 2007). Der mechanistische Zusammenhang zwischen *RISK* und *SAFE* und ihre Interaktionen sind Gegenstand aktueller Studien (Lecour, 2009).

Die vorliegenden Untersuchungen legen nahe, dass der *RISK* bei der Myokardprotektion durch IP keine Rolle spielt. Es scheint jedoch weiterhin so, dass alle protektiven Signaltransduktionswege auf die Mitochondrien projizieren (Übersichtsartikel: Heusch *et al.*, 2008a). Somit werden Mitochondrien auch in zukünftigen Studien zur Myokardprotektion eine zentrale Rolle spielen.

## 5. Zusammenfassung

Ischämie und Reperfusion (IR) führen am Herzen zur Infarzierung des betroffenen Myokardareals. Ischämische Postkonditionierung (IP) reduziert die Infarktgröße nach IR. Es ist umstritten, ob eine Aktivierung des „*Reperfusion Injury Salvage Kinase* - Signaltransduktionsweges“ (*RISK*) ursächlich für den vermittelten Schutz ist.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Auswirkungen von IP auf die Infarktgröße nach IR und die Rolle des *RISK* bei der Infarktgrößenreduktion durch IP an narkotisierten Göttinger Minischweinen untersucht. Die Tiere wurden einer 90 - minütigen Hypoperfusion des *Ramus interventricularis anterior* und einer 120 - minütigen Reperfusion unterzogen. Einer sofortigen vollständigen Reperfusion (SVR) wurde IP mit sechs Zyklen à 20 s IR gegenübergestellt. In einem weitergehenden Schritt wurde der *RISK* durch intrakoronare Infusion von Wortmannin und U0126 gehemmt und die Infarktgröße nach IR mit IP oder SVR gemessen.

Durch IP wurde die Infarktgröße auf  $20 \pm 3\%$  des Risikoareals (Mittelwert  $\pm$  SEM) im Vergleich zu  $33 \pm 4\%$  nach SVR reduziert. Die in der Western Blot Analyse gemessene Phosphorylierung des *RISK* unterschied sich zu keinem Zeitpunkt zwischen IP und SVR. Auch bei im Western Blot bestätigter Inhibierung des *RISK* konnte die Infarktgröße durch IP ( $15 \pm 7\%$ ) im Vergleich zu SVR ( $35 \pm 6\%$ ;  $p < 0,05$ ) reduziert werden.

IP reduziert auch am Schwein die Infarktgröße nach IR. Die Aktivierung des *RISK* scheint für den vermittelten Schutz nicht ursächlich zu sein.

## 6. Literaturverzeichnis

- (1) Alstrup A. (2010):  
Anaesthesia and Analgesia in Ellegaard Göttingen minipigs.  
Online - Publikation: <http://www.minipigs.dk>
- (2) Becker L.C. (1997):  
Myocardial reperfusion injury.  
J Thromb Thrombolysis 4, 43-45.
- (3) Boengler K., Buechert A., Heinen Y., Roeskes C., Hilfiker-Kleiner D., Heusch G., Schulz R. (2008a):  
Cardioprotection by ischemic postconditioning is lost in aged and STAT3-deficient mice.  
Circ.Res. 102, 131-135.
- (4) Boengler K., Hilfiker-Kleiner D., Drexler H., Heusch G., Schulz R. (2008b):  
The myocardial JAK/STAT pathway: from protection to failure.  
Pharmacol Therap 120, 172-185.
- (5) Boengler K., Hilfiker-Kleiner D., Heusch G., Schulz R. (2010):  
Inhibition of permeability transition pore opening by mitochondrial STAT3 and its role in myocardial ischemia/reperfusion.  
Basic Res.Cardiol. 105, 771-785.
- (6) Bopassa J.-C., Ferrera R., Gateau-Roesch O., Couture-Lepetit E., Ovize M. (2006):  
PI 3-kinase regulates the mitochondrial transition pore in controlled reperfusion and postconditioning.  
Cardiovasc Res 69, 178-185.

- (7) Burley D.S., Ferdinandy P., Baxter G.F. (2007):  
Cyclic GMP and protein kinase-G in myocardial ischaemia-reperfusion:  
opportunities and obstacles for survival signaling.  
Br.J Pharmacol. 152, 855-869.
- (8) Burns R.J., Gibbons R.J., Yi Q., Roberts R.S., Miller T.D., Schaer G.L., Anderson J.L., Yusuf S. (2002):  
The relationships of left ventricular ejection fraction, end-systolic volume index and infarct size to six-month mortality after hospital discharge following myocardial infarction treated by thrombolysis.  
J Am Coll Cardiol 39, 30-36.
- (9) Cohen M.V., Yang X.M., Downey J.M. (2007):  
The pH hypothesis of postconditioning: staccato reperfusion reintroduces oxygen and perpetuates myocardial acidosis.  
Circulation 115, 1895-1903.
- (10) Costa A.D., Pierre S.V., Cohen M.V., Downey J.M., Garlid K.D. (2008):  
cGMP signalling in pre- and post-conditioning: the role of mitochondria.  
Cardiovasc Res 77, 344-352.
- (11) Darling C.E., Jiang R., Maynard M., Whittaker P., Vinten-Johansen J., Przyklenk K. (2005):  
Postconditioning via stuttering reperfusion limits myocardial infarct size in rabbit hearts: role of ERK1/2.  
Am J Physiol Heart Circ Physiol 289, H1618-H1626.
- (12) Donato M., D'Annunzio V., Berg G., Gonzalez G., Schreier L., Morales C., Wikinski R.L., Gelpi R.J. (2007):  
Ischemic postconditioning reduces infarct size by activation of A1 receptors and K<sup>+</sup>(ATP) channels in both normal and hypercholesterolemic rabbits.  
J.Cardiovasc.Pharmacol. 49, 287-292.

- (13) Downey J.M., Davis A.M., Cohen M.V. (2007):  
Signaling pathways in ischemic preconditioning.  
Heart Fail.Rev 12, 181-188.
  
- (14) Dudley T., Pang L., Decker S.J., Bridges A.J., Saltiel. (1995):  
A synthetic inhibitor of the mitogen-activated protein kinase cascade.  
Proc Natl Acad Sci USA 95, 7686-7689.
  
- (15) Ferdinandy P., Schulz R., Baxter G.F. (2007):  
Interaction of cardiovascular risk factors with myocardial ischemia/reperfusion  
injury, preconditioning, and postconditioning.  
Pharmacol.Rev. 59, 418-458.
  
- (16) Fuglestad B.N., Suleman N., Tiron C., Kanhema T., Lacerda L., Andreasen T.V.,  
Sack M.N., Jonassen A.K., Mjos O.D., Opie L.H., Lecour S. (2008):  
Signal transducer and activator of transcription 3 is involved in the cardioprotective  
signalling pathway activated by insulin therapy at reperfusion.  
Basic Res Cardiol 103, 444-453.
  
- (17) Fujita M., Asanuma H., Hirata A., Wakeno M., Takahama H., Sasaki H., Kim J.,  
Takashima S., Tsukamoto O., Minamino T., Shinozaki Y., Tomoike H., Hori M.,  
Kitakaze M. (2007):  
Prolonged transient acidosis during early reperfusion contributes to the  
cardioprotective effects of postconditioning.  
Am.J Physiol Heart Circ.Physiol 292, H2004-H2008.
  
- (18) Gomez L., Paillard M., Thibault H., Derumeaux G., Ovize M. (2008):  
Inhibition of GSK3beta by postconditioning is required to prevent opening of the  
mitochondrial permeability transition pore during reperfusion.  
Circulation 117, 2761-2768.
  
- (19) Griffiths E.J., Halestrap A.P. (1995):  
Mitochondrial non-specific pores remain closed during cardiac ischaemia, but open

upon reperfusion.

Biochem.J 307 ( Pt 1), 93-98.

- (20) Hausenloy D.J., Yellon D.M. (2006):  
Survival kinases in ischemic preconditioning and postconditioning.  
Cardiovasc Res 70, 240-253.
  
- (21) Heusch G. (2004):  
Postconditioning. Old wine in a new bottle?  
J Am Coll Cardiol 44, 1111-1112.
  
- (22) Heusch G., Boengler K., Schulz R. (2008a):  
Cardioprotection: nitric oxide, protein kinases, and mitochondria.  
Circulation 118, 1915-1919.
  
- (23) Heusch G., Skyschally A., Gres P., van Caster P., Schilawa D., Schulz R. (2008b):  
Improvement of regional myocardial blood flow and function and reduction of  
infarct size with ivabradine - protection beyond heart rate reduction.  
Eur Heart J 29, 2265-2275.
  
- (24) Heusch G. (2009):  
No RISK, no ... cardioprotection? A critical perspective.  
Cardiovasc Res 84, 173-174.
  
- (25) Heusch G., Musiolik J., Gedik N., Skyschally A. (2011a):  
Mitochondrial STAT3 activation and cardioprotection by ischemic  
postconditioning in pigs with regional myocardial ischemia/reperfusion.  
Circ.Res. 109, 1302-1308.
  
- (26) Heusch G., Skyschally A., Schulz R. (2011b):  
The in-situ pig heart with regional ischemia/reperfusion - Ready for translation.  
J.Mol.Cell Cardiol.

- (27) Heymann M.A., Payne B.D., Hoffman J.I.E., Rudolph A.M. (1977):  
Blood flow measurements with radionuclide- labeled particles.  
Prog Cardiovasc Dis 20, 55-78.
  
- (28) Hirata A., Minamino T., Assanuma H., Fujita M., Wakeno M., Myoshi M.,  
Tsukamoto O., Okada K., Koyama H., Komamura K., Takeshima S., Shinozaki Y.,  
Mori H., Shiraga M., Kitakaze M., Hori M. (2006):  
Erythropoietin enhances neovascularization of ischemic myocardium and improves  
left ventricular dysfunction after myocardial infarction in dogs.  
J Am Coll Cardiol 48, 176-184.
  
- (29) Iliodromitis E.K., Georgiadis M., Cohen M.V., Downey J.M., Bofilis E.,  
Kremastinos D.T. (2006):  
Protection from postconditioning depends on the number of short ischemic insults  
in anesthetized pigs.  
Basic Res.Cardiol. 101, 502-507.
  
- (30) Inserte J., Barba I., Hernando V., Abellan A., Ruiz-Meana M., Rodriguez-Sinovas  
A., Garcia-Dorado D. (2008):  
Effect of acidic reperfusion on prolongation of intracellular acidosis and  
myocardial salvage.  
Cardiovasc Res 77, 782-790.
  
- (31) Javadov S., Hunter J.C., Barreto-Torres G., Parodi-Rullan R. (2011):  
Targeting the mitochondrial permeability transition: cardiac ischemia-reperfusion  
versus carcinogenesis.  
Cell Physiol Biochem. 27, 179-190.
  
- (32) Jin Z.Q., Karliner J.S., Vessey D.A. (2008):  
Ischaemic postconditioning protects isolated mouse hearts against  
ischaemia/reperfusion injury via sphingosine kinase isoform-1 activation.  
Cardiovasc Res 79, 134-140.



- (33) Juhaszova M., Zorov D.B., Kim S.-H., Pepe S., Fu Q., Fishbein K.W., Ziman B.D., Wang S., Ytrehus K., Antos C.L., Olson E.N., Sollott S.J. (2004): Glycogen synthase kinase-3 $\beta$  mediates convergence of protection signaling to inhibit the mitochondrial permeability transition pore. *J Clin Invest* 113, 1535-1549.
- (34) Kelly R., King J., Lecour S. (2008): Sphingosine-1-phosphate induced cardioprotection is mediated by STAT-3. *J Mol Cell Cardiol* 44, 740 (Abstract).
- (35) Kerr P.M., Suleiman M.S., Halestrap A.P. (1999): Reversal of permeability transition during recovery of hearts from ischemia and its enhancement by pyruvate. *Am.J.Physiol* 276, H496-H502.
- (36) Kin H., Zhao Z.-Q., Sun H.-Y., Wang N.-P., Corvera J.S., Halkos M.E., Kerendi F., Guyton R.A., Vinten-Johansen J. (2004): Postconditioning attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury by inhibiting events in the early minutes of reperfusion. *Cardiovasc Res* 62, 74-85.
- (37) Lacerda L., Somers S., Opie L.H., Lecour S. (2009): Ischemic postconditioning protects against reperfusion injury via the SAFE pathway. *Cardiovasc Res* 84, 201-208.
- (38) Lecour S., Smith R.M., Woodward B., Opie L.H., Rochette L., Sack M.N. (2002): Identification of a novel role for sphingolipid signaling in TNF $\alpha$  and ischemic preconditioning mediated cardioprotection. *J Mol Cell Cardiol* 34, 509-518.
- (39) Lecour S., Suleman N., Deuchar G.A., Somers S., Lacerda L., Huisamen B., Opie L.H. (2005): Pharmacological preconditioning with tumor necrosis factor- $\alpha$  activates signal

transducer and activator of transcription-3 at reperfusion without involving classic prosurvival kinases (Akt and extracellular signal-regulated kinase).

Circulation 112, 3911-3918.

- (40) Lecour S. (2009):  
Activation of the protective survivor activating factor enhancement (SAFE) pathway against reperfusion injury: Does it go beyond the RISK path?  
J Mol.Cell Cardiol 47, 32-40.
- (41) Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. (1951):  
Protein measurement with the folin phenol reagent.  
J Biol Chem 193, 265-275.
- (42) Manintveld O.C., Te Lintel H.M., van den Bos E.J., Suurenbroek G.M., Dekkers D.H., Verdouw P.D., Lamers J.M., Duncker D.J. (2007):  
Cardiac effects of postconditioning depend critically on the duration of index ischemia.  
Am.J Physiol Heart Circ.Physiol 292, H1551-H1560.
- (43) Morrison R.R., Tan X.L., Ledent C., Mustafa S.J., Hofmann P.A. (2007):  
Targeted deletion of A2A adenosine receptors attenuates the protective effects of myocardial postconditioning.  
Am J Physiol Heart Circ.Physiol 293, H2523-H2529.
- (44) Murphy E., Steenbergen C. (2008):  
Does inhibition of glycogen synthase kinase protect in mice?  
Circ Res 103, 226-228.
- (45) Mykytenko J., Kerendi F., Reeves J.G., Kin H., Zatta A.J., Jiang R., Guyton R.A., Vinten-Johansen J., Zhao Z.Q. (2007):  
Long-term inhibition of myocardial infarction by postconditioning during reperfusion.  
Basic Res Cardiol 102, 90-100.

- (46) Nishino Y., Webb I.G., Davidson S.M., Ahmed A.I., Clark J.E., Jacquet S., Shah A.M., Miura T., Yellon D.M., Avkiran M., Marber M.S. (2008):  
Glycogen synthase kinase-3 inactivation is not required for ischemic preconditioning or postconditioning in the mouse.  
Circ.Res. 103, 307-314.
- (47) Ovize M., Baxter G.F., Di L.F., Ferdinandy P., Garcia-Dorado D., Hausenloy D.J., Heusch G., Vinten-Johansen J., Yellon D.M., Schulz R. (2010):  
Postconditioning and protection from reperfusion injury: where do we stand?  
Position paper from the Working Group of Cellular Biology of the Heart of the European Society of Cardiology.  
Cardiovasc.Res. 87, 406-423.
- (48) Penna C., Tullio F., Merlino A., Moro F., Raimondo S., Rastaldo R., Perrelli M.G., Mancardi D., Pagliaro P. (2009):  
Postconditioning cardioprotection against infarct size and post-ischemic systolic dysfunction is influenced by gender.  
Basic Res.Cardiol. 104, 390-402.
- (49) Pfeffer M.A., Braunwald E. (1990):  
Ventricular remodeling after myocardial infarction. Experimental observations and clinical implications.  
Circulation 81, 1161-1172.
- (50) Philipp S, Downey JM, Cohen MV. (2004):  
Postconditioning must be initiated in less than 1 minute following reperfusion and is dependent on adenosine receptors and PI3-kinase.  
Circulation , III-168.
- (51) Philipp S., Yang X.-M., Cui L., Davis A.M., Downey J.M., Cohen M.V. (2006):  
Postconditioning protects rabbit hearts through a protein kinase C-adenosine A<sub>2b</sub> receptor cascade.  
Cardiovasc Res 70, 308-314.

- (52) Piot C., Croisille P., Staat P., Thibault H., Rioufol G., Mewton N., Elbelghiti R., Cung T.T., Bonnefoy E., Angoulvant D., Macia C., Raczka F., Sportouch C., Gahide G., Finet G., Andre-Fouet X., Revel D., Kirkorian G., Monassier J.-P., Derumeaux G., Ovize M. (2008):  
Effect of cyclosporine on reperfusion injury in acute myocardial infarction.  
*N Engl J Med* 359, 473-481.
- (53) Przyklenk K., Vivaldi M.T., Schoen F.J., Malcolm J., Arnold O., Kloner R.A. (1986):  
Salvage of ischaemic myocardium by reperfusion: importance of collateral blood flow and myocardial oxygen demand during occlusion.  
*Cardiovasc.Res.* 20, 403-414.
- (54) Przyklenk K., Maynard M., Darling C.E., Whittaker P. (2008):  
Aging mouse hearts are refractory to infarct size reduction with post-conditioning.  
*J Am Coll.Cardiol* 51, 1393-1398.
- (55) Schaper W., Gorge G., Winkler B., Schaper J. (1988a):  
The collateral circulation of the heart.  
*Prog.Cardiovasc.Dis.* 31, 57-77.
- (56) Schulz R., Heusch G. (2009):  
Tumor necrosis factor- $\alpha$  and its receptors 1 and 2: Yin and Yang in myocardial infarction?  
*Circulation* 119, 1355-1357.
- (57) Schwartz L.L., Kloner R.A., Arai A.E., Baines C.P., Bolli R., Braunwald E., Downey J., Gibbons R.J., Gottlieb R.A., Heusch G., Jennings R.B., Lefer D.J., Mentzer R.M., Murphy E., Ovize M., Ping P., Przyklenk K., Sack M.N., Vander Heide R.S., Vinten-Johansen J., Yellon D.M. (2011):  
New horizons in cardioprotection: recommendations from the 2010 National Heart, Lung, and Blood Institute Workshop.  
*C* 124, 1172-1179.

- (58) Schwartz L.M., Lagranha C.J. (2006):  
Ischemic postconditioning during reperfusion activates AKT and ERK without protecting against lethal myocardial ischemia-reperfusion injury in pigs.  
*Am J Physiol Heart Circ Physiol* 290, H1011-H1018.
- (59) Schwarz E.R., Somoano Y., Hale S.L., Kloner R.A. (2000):  
What is the required reperfusion period for assessment of myocardial infarct size using triphenyltetrazolium chloride staining in the rat?  
*J Thromb Thrombolysis* 10, 181-187.
- (60) Sivaraman V., Mudalgiri N.R., Di S.C., Kolvekar S., Hayward M., Yap J., Keogh B., Hausenloy D.J., Yellon D.M. (2007):  
Postconditioning protects human atrial muscle through the activation of the RISK pathway.  
*Basic Res. Cardiol.* 102, 453-459.
- (61) Skyschally A., Schulz R., Heusch G. (1993):  
Cordat II: A new program for data acquisition and on-line calculation of hemodynamic and regional myocardial dimension parameters.  
*Comput Biol Med* 23, 359-367.
- (62) Skyschally A., Gres P., Hoffmann S., Haude M., Erbel R., Schulz R., Heusch G. (2007):  
Bidirectional role of tumor necrosis factor- $\alpha$  in coronary microembolization: progressive contractile dysfunction versus delayed protection against infarction.  
*Circ.Res* 100, 140-146.
- (63) Skyschally A., Schulz R., Heusch G. (2008):  
Pathophysiology of myocardial infarction: protection by ischemic pre- and postconditioning.  
*Herz* 33, 88-100.
- (64) Skyschally A., van Caster P., Iliodromitis E.K., Schulz R., Kremastinos D.T., Heusch G. (2009):

Ischemic postconditioning - experimental models and protocol algorithms.  
Basic Res Cardiol 104, 469-483.

- (65) Staat P., Rioufol G., Piot C., Cottin Y., Cung T.T., L'Huillier I., Aupetit J.-F., Bonnefoy E., Finet G., Andre-Fouet X., Ovize M. (2005):  
Postconditioning the human heart.  
Circulation 112, 2143-2148.
- (66) Strohm C., Barancik M., v.Brühl M.L., Kilian S.A.R., Schaper W. (2000):  
Inhibition of the ER-kinase cascade by PD98059 and UO126 counteracts ischemic preconditioning in pig myocardium.  
J Cardiovasc Pharmacol 36, 218-229.
- (67) Sutton M.St.J., Pfeffer M.A., Moye L., Plappert T., Rouleau J.L., Lamas G., Rouleau J., Parker J.O., Arnold M.O., Sussex B., Braunwald E. (1997):  
Cardiovascular death and left ventricular remodeling two years after myocardial infarction.  
Circulation 96, 3294-3299.
- (68) Thibault H., Piot C., Staat P., Bontemps L., Sportouch C., Rioufol G., Cung T.T., Bonnefoy E., Angoulvant D., Aupetit J.F., Finet G., Andre-Fouet X., Macia J.C., Raczka F., Rossi R., Itti R., Kirkorian G., Derumeaux G., Ovize M. (2008):  
Long-term benefit of postconditioning.  
Circulation 117, 1037-1044.
- (69) Tsang A., Hausenloy D.J., Mocanu M.M., Yellon D.M. (2004):  
Postconditioning: A form of "Modified Reperfusion" protects the myocardium by activating the phosphatidylinositol 3-kinase-Akt pathway.  
Circ Res 95, 230-232.
- (70) Vinten-Johansen J. (2007):  
Postconditioning: a mechanical maneuver that triggers biological and molecular cardioprotective responses to reperfusion.  
Heart Fail.Rev. 12, 235-244.

- (71) Wymann M.P., Bulgarelli-Leva G., Zvelebil M.J., Pirola L., Vanhaesebroeck B., Waterfield M.D., Panayotou G. (1996):  
Wortmannin inactivates phosphoinositide 3-kinase by covalent modification of Lys-802, a residue involved in the phosphate transfer reaction.  
Mol Cell Biol. 16, 1722-1733.
- (72) Yang X.-M., Proctor J.B., Cui L., Krieg T., Downey J.M., Cohen M.V. (2004):  
Multiple, brief coronary occlusions during early reperfusion protect hearts by targeting cell signaling pathways.  
J Am Coll Cardiol 44, 1103-1110.
- (73) Yang X.-M., Philipp S., Downey J.M., Cohen M.V. (2005):  
Postconditioning's protection is not dependent on circulating blood factors or cells but involves adenosine receptors and requires PI3-kinase and guanylyl cyclase activation.  
Basic Res Cardiol 100, 57-63.
- (74) Zhao Z.-Q., Corvera J.S., Halkos M.E., Kerendi F., Wang N.-P., Guyton R.A., Vinten-Johansen J. (2003):  
Inhibition of myocardial injury by ischemic postconditioning during reperfusion: comparison with ischemic preconditioning.  
Am J Physiol Heart Circ Physiol 285, H579-H588.

## 7. Anhang

### 7.1 Abbildungsverzeichnis

1.1	Schema der ischämischen Postkonditionierung.....	7
1.2	Schema des <i>Reperfusion Injury Salvage Kinase</i> - Signaltransduktionsweges.....	10
1.3	Alternative Signaltransduktionswege der ischämischen Postkonditionierung.....	11
2.1	Schematische Darstellung der Instrumentierung .....	21
3.1	Infarktgröße.....	29
3.2	Infarktgröße als Funktion der subendokardialen Restdurchblutung während der Ischämie.....	30
3.3	Infarktgröße unter Inhibierung des <i>Reperfusion Injury Salvage Kinase</i> – Signaltransduktionsweges.....	31
3.4	Repräsentative Western Blots der Phospho - und Gesamtformen der Kinasen AKT, ERK1/2, P70S6K, GSK3 $\beta$ aus Myokardbiopsien des Risikoareals und gemittelte Zeitverläufe der Phosphorylierung des <i>Reperfusion Injury Salvage Kinase</i> - Signaltransduktionsweges.....	34
3.5	Repräsentative Western Blots der Phospho - und Gesamtformen der Kinasen AKT, ERK1/2, P70S6K, GSK3 $\beta$ aus Myokardbiopsien des Kontrollareals und gemittelte Zeitverläufe der Phosphorylierung des <i>Reperfusion Injury Salvage Kinase</i> – Signaltransduktionsweges.....	35
3.6	Repräsentative Western Blots der Phospho - und Gesamtformen der Kinasen AKT, ERK1/2, P70S6K, GSK3 $\beta$ aus Myokardbiopsien des Risikoareals und gemittelte Zeitverläufe der Phosphorylierung unter Inhibierung mit Wortmannin und U0126.....	36

### 7.2 Tabellenverzeichnis

3.1	Systemische Hämodynamik.....	27
3.2	Subendokardiale Restdurchblutung während Ischämie.....	28
3.3	Größe des Risikoareals.....	28
3.4	Phosphorylierung des <i>Reperfusion Injury Salvage Kinase</i> - Signaltransduktionsweges in Myokardbiopsien.....	32



3.5	Western Blot Analyse der Phosphorylierung der Kinasen AKT, ERK1/2, P70S6K, GSK3 $\beta$ aus nach 10 min Reperfusion entnommenen Biopsien aus infarziertem vs. vitalem Gewebe.....	37
-----	---	----

### 7.3 Abkürzungsverzeichnis

$\mu\text{g}$	Mikrogramm
$\mu\text{l}$	Mikroliter
$\mu\text{m}$	Mikrometer
Abb.	Abbildung
<i>A. dest.</i>	destilliertes Wasser ( <i>Aqua destillata</i> )
AKT	Proteinkinase B
ANOVA	Varianzanalyse ( <i>analysis of variance</i> )
ATP	Adenosintriphosphat
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CAP	koronararterieller Perfusionsdruck ( <i>coronary arterial pressure</i> )
CAP <sub>mean</sub>	mittlerer koronararterieller Perfusionsdruck ( <i>mean coronary arterial pressure</i> )
CAP <sub>min</sub>	minimaler koronararterieller Perfusionsdruck ( <i>minimal coronary arterial pressure</i> )
CBF	koronarer Blutfluss ( <i>mean coronary blood flow</i> )
CBF <sub>mean</sub>	mittlerer koronarer Blutfluss ( <i>mean coronary blood flow</i> )
$^{141}\text{Ce}$	Cerisotop 141
$^{51}\text{Cr}$	Chromisotop 51
DMSO	Dimethylsulfoxid
dP/dt <sub>max</sub>	Maximum der ersten Ableitung des LVP nach der Zeit
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ERK1/2	extrazellulär Signal - regulierte Kinase
<i>et al.</i>	und andere ( <i>et alii</i> )
EtOH	Ethanol
FGF	Fibroblastenwachstumsfaktor ( <i>fibroblast growth factor</i> )
g	Gramm
GFR	Wachstumsfaktorrezeptor ( <i>growth factor receptor</i> )

GPCR	G - Protein gekoppelter Rezeptor ( <i>G protein – coupled receptor</i> )
GSK3 $\beta$	Glykogen - Synthase - Kinase 3 beta
h	Stunde(n)
HES	Hydroxyethylstärkelösung
HF	Herzfrequenz
i. E.	Internationale Einheiten
IGF	insulinähnlicher Wachstumsfaktor ( <i>insulin - like growth factor</i> )
IgG	Immunglobulin G
i. m.	intramuskulär
IP	Ischämische Postkonditionierung
IP+I	Ischämische Postkonditionierung mit Inhibierung des Injury Salvage Kinase - Signaltransduktionsweges
IR	Ischämie und Reperfusion
ISCH	Ischämie
i. v.	intravenös
JAK	Janus Kinase
KB	Kontrollbedingung(en)
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
l	Liter
LVP	linksventrikulärer Druck ( <i>left ventricular pressure</i> )
LVPmax	maximaler linksventrikulärer Druck ( <i>maximal left ventricular pressure</i> )
MEK1/2	Mitogen - aktivierte Proteinkinase
mg	Milligramm
min	Minute(n)
ml	Milliliter
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule (Druckeinheit)
MOPS	3 - (N - Morpholino) - Propansulfonsäure
mPTP	mitochondriale Permeabilitäts - Transitions - Pore
n	Anzahl
NIH	National Institutes of Health
p	Irrtumswahrscheinlichkeit
<i>p. A.</i>	<i>pro analysi</i>
P70S6K	P70 ribosomale S6 Proteinkinase

PEG400	Polyethylenglycol
<i>pH</i>	<i>pondus Hydrogenii</i> oder <i>potentia Hydrogenii</i>
PI3K	Phosphatidylinositol - 3 - Kinase
PKG	Proteinkinase G
REP	Reperfusion
<i>RISK</i>	<i>Reperfusion Injury Salvage Kinase</i> - Signaltransduktionsweg
<sup>103</sup> Ru	Rutheniumisotop 103
s	Sekunde
<i>SAFE</i>	<i>Survivor Activating Factor Enhancement</i>
<sup>46</sup> Sc	Scandiumisotop 46
SDS	Natriumdodecylsulfat ( <i>Sodium dodecyl sulphate</i> )
STAT	<i>Signal Transducer and Activator of Transcription</i>
SVR	Sofortige vollständige Reperfusion
SVR+I	Sofortige vollständige Reperfusion mit Inhibierung des Injury Salvage Kinase - Signaltransduktionsweges
Tab.	Tabelle
TBS	Tris - gepufferte Natriumchloridlösung ( <i>Tris buffered saline</i> )
TBS-T	Tris - gepufferte Natriumchloridlösung mit Tween
TNF $\alpha$	Tumor - Nekrose - Faktor $\alpha$
TRIS	Tris(hydroxymethyl) - Aminomethan / Tromethamin / Trometamol
TTC	Triphenyltetrazoliumchlorid
vs.	gegen, gegenüber gestellt ( <i>versus</i> )
z. B.	zum Beispiel

## 8. Danksagung

Die Experimente der vorliegenden Arbeit wurden in den Jahren 2005 bis 2009 am Institut für Pathophysiologie, Zentrum für Innere Medizin, Universitätsklinikum Essen durchgeführt.

Mein besonderer Dank gilt meinem wissenschaftlichen Lehrer Prof. Dr. med. Dr. h.c. Gerd Heusch für die Überlassung des Themas und die weitreichende Unterstützung meiner wissenschaftlichen Laufbahn. Fachlich und menschlich habe ich sehr viel von ihm lernen dürfen.

Mein Dank gilt auch Prof. Dr. rer. nat. Ursula Rauen für die Bereitschaft zur Übernahme des Koreferats.

Außerordentlich bedanke ich mich bei Herrn PD Dr. rer. medic. Andreas Skyschally für die ausgezeichnete Betreuung meiner Arbeit. Es wird mir unvergessen bleiben, dass er mir zu jeder Tages - und Nachtzeit zur Seite stand.

Petra Gres danke herzlich ich dafür, dass sie die tierexperimentellen Arbeiten tatkräftig unterstützte, mir die Instrumentierung der Tiere beibrachte und immer im richtigen Moment aufmunternde Worte fand.

Ich danke Frau PD Dr. rer. nat. Kerstin Böngler dafür, dass sie mir mit endloser Geduld und Sorgfalt die molekularbiologische Techniken beibrachte, jederzeit eine helfende Hand, Ratschläge und Problemlösungen für mich hatte.

Darüber hinaus danke ich Herrn Prof. Dr. med. Rainer Schulz für eine fruchtbare Mischung aus kritischen Diskussionen und humorvollen Begegnungen. Neben vielen wertvollen Anregungen lernte ich von ihm, wie viel Freude anspruchsvolle Wissenschaft bereiten kann.

---

Bei Astrid Büchert, Simone Hoffmann, Judith Musiolik, Anita van de Sand, Dustin Schilawa, Sabine Stahlhofen und allen anderen Mitgliedern der Arbeitsgruppe möchte ich mich für die stets hilfsbereite und zwischenmenschlich sehr angenehme Zusammenarbeit bedanken.

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern, die mich in jeglicher Weise unterstützten, immer für mich da waren und mir Halt und Kraft gaben. Ohne sie wäre diese Arbeit niemals möglich gewesen.

Ich widme diese Arbeit meinem Vater, der uns viel zu früh verlassen musste.

## **9. Lebenslauf**

- Der Lebenslauf ist in der online - Version nicht sichtbar -

---

## ORIGINALARBEITEN

---

Heusch G., Skyschally A., Gres P., **van Caster P.**, Schilawa D., Schulz R. (2008):  
Improvement of regional myocardial blood flow and function and reduction of infarct size  
with ivabradine - protection beyond heart rate reduction.

Eur Heart J 29, 2265-2275.

Skyschally A., Gres P., **van Caster P.**, van de Sand A., Boengler K., Schulz R., Heusch G.  
(2008):

Reduced calcium responsiveness characterizes contractile dysfunction following coronary  
microembolization.

Basic Res Cardiol 103, 552-559.

Skyschally A.\*, **van Caster P.\***, Boengler K., Gres P., Musiolik J., Schilawa D., Schulz  
R., Heusch G. (2009):

Ischemic postconditioning in pigs: no causal role for RISK activation.

Circ Res 104, 15-18.

\* - die Autoren trugen zu gleichen Teilen bei

Musiolik J., **van Caster P.**, Skyschally A., Boengler K., Gres P., Schulz R., Heusch G.  
(2010):

Reduction of infarct size by gentle reperfusion without activation of reperfusion injury  
salvage kinases in pigs.

Cardiovasc Res 85, 110-117.

## ÜBERSICHTSARBEIT

---

Skyschally A., **van Caster P.**, Iliodromitis EK., Schulz R., Kremastinos DT., Heusch G.  
(2009):

Ischemic postconditioning - experimental models and protocol algorithms.

Basic Res Cardiol 104, 469-483.

## VORTRÄGE

---

Skyschally A., Gres P., Hoffmann S., **van Caster P.**, Schulz R., Heusch G.:

Delayed myocardial protection following coronary microembolization is mediated by  
TNF- $\alpha$ .

---

26th European Section Meeting of the International Society for Heart Research. 14.06. - 17.06.2006, Manchester, Großbritannien.

Skyschally A., Gres P., Hoffmann S., **van Caster P.**, Schulz R., Heusch G.:

Bidirektionale Wirkung von TNF- $\alpha$  nach koronarer Mikroembolisation: progrediente myokardiale Dysfunktion versus verzögerter Schutz gegen Infarzierung.

73. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie. 12.04. - 14.04.2007, Mannheim, Deutschland.

Skyschally A., Gres P., **van Caster P.**, Schulz R., di Lisa F., Heusch G.:

Reduced myocardial calcium responsiveness after coronary microembolization.

27th European Section Meeting of the International Society for Heart Research. 20.06. - 22.06.2007, Padova, Italien.

Skyschally A., Gres P., **van Caster P.**, Schulz R., Heusch G.:

Postconditioning reduces infarct size after ischemia/reperfusion in pigs.

World Congress of the International Society for Heart Research. 22.06. - 25.06.2007, Bologna, Italien.

**van Caster P.**, Skyschally A., Gres P., Boengler K., Schulz R., Heusch G.:

Ischämische Postkonditionierung am Schwein – keine zusätzliche Aktivierung der RISK-Kinasen gegenüber sofortiger Reperfusion.

74. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie. 27.03. - 29.03.2008, Mannheim, Deutschland.

Skyschally A., Gres P., **van Caster P.**, Schilawa D., Schulz R., Heusch G.:

Verbesserung der regionalen myokardialen Durchblutung und Funktion und Reduktion der Infarktgröße durch selektive Herzfrequenzsenkung mit Ivabradin.

74. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie. 27.03. - 29.03.2008, Mannheim, Deutschland.

**van Caster P.**, Skyschally A., Gres P., Boengler K., Schulz R., Heusch G.:

Ischemic postconditioning in pigs - no RISK activation beyond that by immediate full reperfusion.

---



American Heart Association Scientific Sessions. 09.11. - 11.11.2008, New Orleans, Louisiana, USA.

Skyschally A., Gres P., **van Caster P.**, Schilawa D., Schulz R., Heusch G.:

Improvement of regional myocardial blood flow and function and reduction of infarct size by selective heart rate reduction with Ivabradine.

ESC Congress der European Society of Cardiology. 30.08. - 03.09.2008, München, Deutschland.

Braun S., Donner M., Kolb T., Strucks C., Cebula P., **van Caster P.**, Herebian D., Bauer I., Pannen B., Häussinger D.:

Einfluss des organischen Osmolyts Taurin auf die sekretorische Funktion der Leber nach Ischämie und Reperfusion.

Wissenschaftliche Arbeitstage der Deutschen Gesellschaft für Anästhesiologie und Intensivmedizin, 10.02. - 11.02.2012, Würzburg, Deutschland.

**van Caster P.:**

Einführungsvortrag des Juniorvorsitzenden zur Sitzung "Experimentelle Ischämie und Sepsisforschung"

59. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Anästhesiologie und Intensivmedizin, 05.05. – 07.05.2012, Leipzig, Deutschland

## **POSTER**

---

**van Caster P.**, Skyschally A., Böngler K., Gres P., Schulz R., Heusch G.:

Postkonditionierung reduziert die Infarktgröße nach Ischämie und Reperfusion beim Schwein.

Forschungstag der medizinischen Fakultät der Universität Duisburg - Essen. 17.11.2006, Essen.

**van Caster P.**, Skyschally A., Musiolik J., Boengler K., Gres P., Schilawa D., Schulz R., Heusch G.:

Am Myokardschutz durch ischämische Postkonditionierung ist Phosphorylierung von RISK nicht beteiligt.

---

Forschungstag der medizinischen Fakultät der Universität Duisburg - Essen. 14.11.2008, Essen.

Musiolik J., **van Caster P.**, Skyschally A., Boengler K., Gres P., Schulz R., Heusch G.:  
Sanfte Reperfusion reduziert die Infarktgröße nach Ischämie ohne Aktivierung /  
Phosphorylierung von "Reperfusion Injury Salvage Kinases".  
Forschungstag der medizinischen Fakultät der Universität Duisburg - Essen. 14.11.2008, Essen.

Schilawa D., Skyschally A., Gres P., **van Caster P.**, Schulz R., Heusch G.:  
Improvement of regional myocardial blood flow and function and reduction of infarct size  
by selective heart rate reduction with Ivabradine.  
Forschungstag der medizinischen Fakultät der Universität Duisburg - Essen. 14.11.2008, Essen.

Musiolik J., **van Caster P.**, Skyschally A., Boengler K., Schilawa D., Gres P., Schulz R.,  
Heusch G.:  
Gentle reperfusion reduces infarct size without activation of reperfusion injury salvage  
kinases in pigs.  
75. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie. 16.04. - 18.04.2009,  
Mannheim, Deutschland.

**van Caster P.**, Strahl T., Grüber Y., Brandenburger T., Metzger S., Bauer I., Pannen B.,  
Braun S.:  
Die microRNA-122 im Serum ist ein organspezifischer Parameter für eine hepatozelluläre  
Schädigung nach Ischämie / Reperfusion der Leber  
59. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Anästhesiologie und Intensivmedizin,  
05.05. – 07.05.2012, Leipzig, Deutschland

**van Caster P.**, Diesel R., Winterhalter M., Jüttner T.:  
Fallbericht: Differentialdiagnostik der respiratorischen Insuffizienz einer Schwangeren mit  
vorzeitigen Wehen  
59. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Anästhesiologie und Intensivmedizin,  
05.05. – 07.05.2012, Leipzig, Deutschland

---

Essen im Juni 2012

---